

**Identifizierung und Analyse
chlamydosporenspezifischer Gene
in *Candida albicans* und *Candida dubliniensis***

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Trophologin Katja Palige
geboren am 07.06.1982 in Sömmerda

1. Gutachter: Dr. rer. nat. habil. Peter Staib
Kneipp GmbH
Winterhäuser Str. 85
97084 Würzburg
2. Gutachter: Prof. Bernhard Hube
3. Gutachter: PD Dr. Steffen Rupp
Abteilung Molekulare Biotechnologie
Nobelstr. 12
70569 Stuttgart

Datum der öffentlichen Verteidigung: 10.04.2014

Zusammenfassung

Candida albicans und *Candida dubliniensis* sind humanpathogene Hefepilze, die neben ihrer engen phylogenetischen Verwandtschaft Unterschiede in der Epidemiologie, Pathogenität und einigen phänotypischen Eigenschaften aufweisen. Als einzige Vertreter im Genus *Candida* sind sie in der Lage, echte Hyphen und Chlamydosporen zu produzieren. Diese Fähigkeit scheint eine große morphologische Flexibilität dieser beiden Spezies darzustellen. Während die Hyphenbildung bereits umfangreich untersucht wurde, ist über die Chlamydosporenbildung und deren genetische Kontrolle bislang wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Chlamydosporenentwicklung zu erhalten. Dafür wurde mit Hilfe von RNA-Sequenzierung und DNA-Microarrayanalysen erstmals ein globales Transkriptionsprofil von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während der Ausbildung von Chlamydosporen erstellt. Ein Hauptziel bestand dabei in der Identifizierung von Proteinen, die spezifisch für diese morphologischen Strukturen sind. Solche Proteine können künftig als Marker für deren Erkennung dienlich sein sowie für die Erforschung der Funktion von Chlamydosporen genutzt werden.

Während des Wachstums auf bestimmten nährstoffarmen Medien sind sowohl *C. albicans* als auch *C. dubliniensis* in der Lage Chlamydosporen zu entwickeln. Auf Staib-Agar jedoch produziert *C. albicans* glatte Hefezellen, wohingegen *C. dubliniensis* filamentös wächst und raue Kolonien mit zahlreichen Chlamydosporen formt. Darüber hinaus ist mit dem Transkriptionsfaktor Nrg1 ein Repressor der Chlamydosporenbildung bekannt, der für die spezies-spezifische Ausbildung der Chlamydosporen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* auf Staib-Agar verantwortlich ist. Während des Wachstums in Staib-Medium ist die Expression des *NRG1*-Gens in *C. dubliniensis*, jedoch nicht in *C. albicans*, herunter reguliert. Zudem resultiert eine Deletion von *NRG1* in *C. albicans* auf Staib-Agar in einer Ausbildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen. Aufgrund dessen war die *C. albicans* *nrg1* Δ -Mutante neben den Wildtyp-Stämmen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ebenfalls Bestandteil der Analysen dieser Arbeit, um so auch die Chlamydosporenbildung in *C. albicans* zu untersuchen.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltene Genexpressionsprofil lieferte schließlich erstmals ein Set von putativ chlamydosporenspezifischen Genen während des Wachstums in Staib-Medium. Mit dem Ziel, innerhalb der Arbeit mögliche

chlamydosporenspezifische Marker zu identifizieren, wurden zwei der am höchsten exprimierten putativen Zellwandgene ausgewählt und aufgrund der im Verlauf dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse als „Chlamydosporenspezifisches-Protein 1 und 2“, *Ca/CdCSP1* und *Ca/CdCSP2* bezeichnet. Mit Hilfe von GFP-Reporterstämmen konnten diese Gene schließlich spezifisch und exklusiv in der Zellwand von *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis*-Chlamydosporen lokalisiert werden.

Ferner wurden weitere, vermeintlich chlamydosporenspezifische, Gene ausgewählt und diese nach Herstellung von Deletionsmutanten und Überexpressionsstämmen hinsichtlich der Chlamydosporenbildung sowie unter nicht-chlamydosporeninduzierenden Bedingungen untersucht. Dabei waren auch phänotypische Parameter von Interesse, bei denen sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* unterscheiden. Eingehend wurde sich in diesem Zusammenhang mit dem *C. albicans*-Transkriptionsfaktor Csr1 beschäftigt, der u. a. als Regulator der Zinkhomöostase für eine erhöhte Expression der Zinktransporter *ZRT1* und *ZRT2* unter zinklimitierten Bedingungen verantwortlich ist und dessen Deletion zu einem starken Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen führt. Das Homolog in *C. dubliniensis* (*CD36_44490*) ist ebenfalls als möglicher Zinkfinger-Transkriptionsfaktor beschrieben. Mit der Deletion des Transkriptionsfaktors Csr1 in *C. dubliniensis* konnte innerhalb der Arbeit, wie für *C. albicans*, ebenfalls eine verminderte Wachstumsfähigkeit unter zinklimitierten Bedingungen festgestellt werden. Der für die *C. albicans* *csr1Δ*-Mutante unter hypheninduzierenden Bedingungen beschriebene Defekt im filamentösen Wachstum konnte für die *Cdcsr1Δ*-Mutante jedoch nicht festgestellt werden.

Insgesamt konnten die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen und wichtigen Einblick in die Chlamydosporenentwicklung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* liefern. Mit der Identifizierung spezifischer Proteine für die morphologische Struktur „Chlamydospore“ liegen nun erstmals mögliche Marker vor, die als wertvolle molekularbiologische Werkzeuge zukünftig zum Einsatz kommen könnten. Ebenso stellen die Ergebnisse eine Basis für weitergehende Untersuchungen dar und können helfen den komplexen Lebenszyklus von *C. albicans* und *C. dubliniensis* besser zu verstehen.

Summary

Candida albicans and *Candida dubliniensis* are highly related pathogenic yeast species but differ in their epidemiology and in some phenotypic characteristics. *C. albicans* and *C. dubliniensis* are distinguished from other *Candida* species by their ability to produce true hyphae and chlamydo-spores. In the past, hyphal formation has been extensively studied whereas only little is known about the biological function and genetic control of chlamydo-spore development. In order to get new insights into the assembly and development of chlamydo-spores, this study aimed to compare the global transcriptional profile of both species during growth on Staib medium by RNA sequencing and DNA microarray analysis. One central point was to identify proteins which are specifically localized in chlamydo-spores. Such markers would be useful to study the morphogenetic development of these cellular entities, and would facilitate the differentiation of chlamydo-spores from other morphological forms.

During *in vitro* growth on special nutrient-poor media, *C. albicans* and *C. dubliniensis* are the only yeast species which are able to produce chlamydo-spores. Interestingly, only *C. dubliniensis* forms pseudohyphae with abundant chlamydo-spores in Staib medium, in which *C. albicans* grows as a budding yeast. We also included a *C. albicans* mutant in our study which lacks the transcriptional repressor Nrg1. This strain, which is known for its constitutive pseudohyphal growth, specifically produces masses of chlamydo-spores in Staib medium, similar to *C. dubliniensis*. Moreover the *NRG1* gene is down regulated in Staib medium in *C. dubliniensis* but not in *C. albicans*.

This comparative approach identified a set of putatively chlamydo-spore related genes. Two of the homologous *C. albicans* and *C. dubliniensis* genes which were most strongly upregulated during chlamydo-spore development were analyzed in more detail. By use of the green fluorescent protein (GFP) as a reporter, the encoded putative cell wall related proteins were exclusively localized to chlamydo-spores, in case of *C. albicans* as well as *C. dubliniensis*. Based on the results of this study these genes are named as “chlamydo-spore-specific-protein 1 and 2”, *Ca/CdCSP1* und *Ca/CdCSP2*.

The role of other selected, putative chlamydo-spore-specific genes identified within this global comparative analysis was studied by phenotypic analysis of knock-out mutants or overexpression strains.

Since *C. dubliniensis* is the closest known relative of *C. albicans* this study also focused on phenotypic characteristics to distinguish *C. albicans* from *C. dubliniensis*. Therefore we addressed the *C. albicans* transcription factor Csr1, which is a regulator of zinc homeostasis and hence responsible for the increased expression of the zinc transporter genes *ZRT1* and *ZRT2* under zinc-limited conditions. Interestingly, in *C. albicans* deletion of the transcription factor Csr1 caused severe growth defects under zinc-limited conditions as well as a filamentation defect under hyphae-induced conditions. The homolog found in *C. dubliniensis* (CD36_44490) is also specified as a potential zinc finger transcription factor. On the one hand, this study showed that the deletion of the transcription factor Csr1 in *C. dubliniensis* leads to the same phenotype under zinc-limited conditions like *C. albicans*. On the other hand, germ-tube formation was unaltered.

Altogether these studies provide new insights into the morphogenetic development of *C. albicans* and *C. dubliniensis* and contribute to a better understanding of the complex lifecycle of these human fungal pathogens. Our findings exposed the first chlamydospore specific markers in *Candida* species. By use of the constructed reporter strains chlamydospore markers may have particular practical value for chlamydospore identification *per se* as well as for further detailed studies on chlamydospore formation, maintenance and germination.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einführung	1
1.2 Der humanpathogene Pilz <i>C. albicans</i>	1
1.2.1 Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i>	3
1.2.2 Polymorphismus als wichtiger Virulenzfaktor von <i>C. albicans</i>	6
1.2.3 Regulation des Polymorphismus in <i>C. albicans</i>	7
1.3 <i>Candida dubliniensis</i>	10
1.3.1 Phänotypische Merkmale	13
1.3.2 Molekularbiologische Merkmale	14
1.3.3 Identifikation	15
1.4 Chlamydosporen	16
1.4.1 Definition	16
1.4.2 Diagnostischer Wert und chlamydosporeninduzierende Medien	16
1.4.3 Chlamydosporenbildung in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	17
1.4.4 Zelluläre Organisation der Chlamydospore	18
1.4.5 Genetische Regulation der Chlamydosporenentwicklung	19
1.5 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	22
2.1.1 Escherichia coli K12-Stamm	22
2.1.2 Plasmide	22
2.2 Verwendete <i>Candida albicans</i> -und <i>Candida dubliniensis</i> -Stämme	24
2.3 Oligonukleotide	30
2.4 Geräte und Chemikalien	34
2.5 Mikrobiologische Methoden	36
2.5.1 Anzucht von <i>E. coli</i>	36
2.5.2 Anzucht von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	36
2.5.3 Standardmedien	36
2.5.4 Selektionsmedien	36
2.5.5 Induktion der Chlamydosporenbildung in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	37
2.5.6 Induktion der Hyphenbildung in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	37
2.6 Molekularbiologische Methoden	38
2.6.1 Plasmidpräparation	39

2.6.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reinigung der PCR-Produkte	39
2.6.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.6.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	40
2.6.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	41
2.6.6	Ligation und Transformation von Plasmid-DNA	41
2.6.7	DNA-Sequenzierung	42
2.6.8	Transformation von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> durch Elektroporation	42
2.6.9	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	43
2.6.10	Southern-Hybridisierung	44
2.6.11	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	45
2.6.12	Prüfung von Qualität und Quantität der RNA	46
2.6.13	Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)	47
2.7	Genexpressionsanalyse	48
2.7.1	Analyse der Genexpression mittels Microarray	48
2.7.2	Analyse der Genexpression mittels RNA-Sequenzierung	50
2.8	Funktionelle Analyse der hergestellten Mutanten-Stämme	51
2.8.1	Verdünnungstropftests	51
2.8.2	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP-Expression	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Morphologie von <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i>	53
3.1.1	Wachstum von <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. albicans</i> und <i>C. albicans nrg1Δ</i> in Staib-Flüssigmedium	53
3.1.2	Evaluierung experimenteller Parameter	54
3.2	Differentielle Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung	55
3.2.1	Differentiell regulierte Gene in Staib-Medium	56
3.2.2	Sequenzspezifität der vier am stärksten herauf regulierten Gene während der Chlamydosporenbildung	61
3.2.3	Quantitative Real-Time-RT-PCR zum Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene	63
3.3	Lokalisation putativer chlamydosporenspezifischer Marker mittels GFP	64
3.3.1	Konstruktion von GFP-Reporterstämmen	64
3.3.2	Konstruktion der Reporterkassetten	65
3.3.3	Konstruktion der GFP-Reporterstämmen	67
3.3.4	Analyse der GFP-Reporterstämmen - Lokalisation von chlamydosporen-spezifischen Markern	69
3.4	Konstruktion von <i>C. dubliniensis</i> -Deletionsmutanten in den Genen <i>CdCSP1</i> und <i>CdCSP2</i>	73
3.4.1	Konstruktion der Deletionskassetten für die Gene <i>CdCSP1</i> und <i>CdCSP2</i>	73
3.4.2	Konstruktion der <i>C. dubliniensis</i> -Einzelmutanten in den Genen <i>CdCSP1</i> bzw. <i>CdCSP2</i>	75
3.5	Phänotypische Analyse der <i>C. dubliniensis</i> -Deletionsmutanten <i>CdCSP1M4</i> und <i>CdCSP2M4</i>	77
3.5.1	Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen	77
3.5.2	Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen	77

3.5.3	Wachstum unter zellwandstressinduzierenden Bedingungen.....	78
3.6	Anwendung der GFP-Reporterstämme.....	80
3.6.1	Chlamydosporeninduktion in Mating-kompetenten Stämmen.....	80
3.6.2	Herstellung von GFP-Reporterstämmen für das Gen <i>CaCSP1</i> in Mating-kompetenten <i>C. albicans</i> -Stämmen.....	81
3.6.3	Untersuchungen zum Wachstum von SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 in Gegenwart von α -Pheromon.....	82
3.7	Untersuchungen zur Chlamydosporenbildung in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> mittels DNA-Microarrayanalyse.....	83
3.7.1	Differentiell regulierte Gene in Staib-Medium vs. YPD-Medium.....	84
3.7.2	Ausgewählte Gene und deren Expressionswerte im DNA-Microarray.....	86
3.7.3	Quantitative Real-Time-RT-PCR zum Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene.....	91
3.8	Konstruktion von Deletionsmutanten in den ausgewählten Genen.....	92
3.8.1	Konstruktion der Deletionskassetten.....	92
3.8.2	Konstruktion der Komplementationskassette des Gens <i>CdCSR1</i>	97
3.8.3	Konstruktion der <i>C. dubliniensis</i> -Einzelmutanten am Beispiel <i>CdCSR1</i> und Komplementation des Gens <i>CdCSR1</i>	98
3.9	Überexpression der Gene <i>RFX1</i> , <i>WOR2</i> , <i>orf19.4046</i> und <i>orf19.6845</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>ADHI</i> -Promotors.....	101
3.9.1	Konstruktion der Expressionskassetten und Überexpressionsstämme.....	101
3.10	Phänotypische Analyse der <i>C. dubliniensis</i> <i>Cdcsr1</i> Δ -Mutante.....	103
3.10.1	Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen.....	103
3.10.2	Wachstum unter zinklimitierten Bedingungen.....	104
3.10.3	Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen.....	108
3.11	Phänotypische Analyse der weiteren hergestellten Deletionsmutanten und der Überexpressionsstämme.....	109
4	Diskussion.....	112
4.1	Identifizierung von chlamydosporenspezifischen Genen in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> mittels RNA-Sequenzierung.....	113
4.1.1	Lokalisation chlamydosporenspezifischer Gene.....	117
4.1.2	Anwendung der GFP-Reporterstämme in mating-kompetenten Stämmen.....	122
4.2	Identifizierung von chlamydosporenspezifischen Genen in <i>C. albicans</i> und <i>C. dubliniensis</i> mittels DNA-Microarrayanalyse.....	124
4.2.1	Funktionelle Analyse ausgewählter chlamydosporenspezifischer Gene.....	126
4.2.2	Deletion des Transkriptionsfaktors Csr1 in <i>C. dubliniensis</i>	128
4.3	Ausblick.....	130
	Literaturverzeichnis.....	132
	Anhang.....	149
	Publikationsliste.....	152
	Lebenslauf.....	153
	Danksagung.....	155

Eigenständigkeitserklärung.....	156
--	------------

Abkürzungsverzeichnis

CD/cd	Candida dubliniensis
CW	Calcofluor White
Δ	Deletion
DRBC-Agar	Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol-Agar
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	Fold Change
FCS	fetalem Kälberserum (fetal calf serum)
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinisitol
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAT	mating-type
MTL	mating type like-Lokus
OD	Optische Dichte
OPC	oropharyngeale Candidose
Orf/orf	Offenes Leseraster (Open Reading Frame)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKA	Proteinkinase A
qRT-PCR	quantitative real-time-(RT)-PCR
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
SAP	sekretorische Aspartatprotease
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SSC	Natrium-Natriumcitratpuffer (Sodium Sodium Citrate Buffer)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TF1/2	Transkriptionsfaktor 1/2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose)
YPM	Hefeextrakt-Pepton-Maltose-Medium (Yeast Extract Peptone Maltose)
ZRE	zink-responsive element

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Im Vergleich zu Infektionserkrankungen bakteriellen oder viralen Ursprungs spielen durch Pilze verursachte Infektionen eine eher untergeordnete Rolle. Es sind derzeit über 1,5 Millionen Pilzarten bekannt (Hawksworth, 2001), von denen etwa 150 ein pathogenes Potential für Säugetiere besitzen und somit von klinischer Bedeutung sind (Kwon-Chung und Bennett, 1992). Dazu gehören unter anderem die Sprosspilze *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans*, der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* sowie eher selten vorkommende dimorphe Pilze wie *Blastomyces dermatitidis* und *Histoplasma capsulatum* (Gow und Gadd, 1995; Odds, 2000). Zudem sind die meisten Erreger von Pilzinfektionen opportunistische Pathogene, d. h. für einen gesunden Menschen stellen diese Pilze keine Gefahr dar, jedoch können sie bei einem geschwächten Immunsystem schwere mukokutane und auch systemische Infektionen verursachen (Odds, 1994). Die dabei am häufigsten isolierten humanpathogenen Pilze sind der Gattung *Candida* zuzuordnen. Da bislang kein sexueller Vermehrungszyklus für *Candida* bekannt ist, werden die Vertreter dieser Gattung den „Fungi imperfecti“ (Deuteromycetes) zugeordnet. Von den insgesamt etwa 200 bekannten *Candida*-Arten tritt *C. albicans* als Haupterreger von pilzbedingten Infektionen in Erscheinung. Neben *C. albicans* sind aber auch *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* und *C. dubliniensis* als Auslöser von Mykosen im Menschen zu nennen.

1.2 Der humanpathogene Pilz *C. albicans*

Candida albicans ist ein fakultativ pathogener Hefepilz aus der Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze), der bereits 1847 von C. Robin beschrieben, jedoch erst 1954 mit dem taxonomischen Namen *C. albicans* offiziell anerkannt wurde (Kurtzmann und Fell, 1998; Calderone, 2002). Als kommensaler Organismus besiedelt *C. albicans* die menschliche Haut sowie die Schleimhäute des oralen, gastrointestinalen und urogenitalen Traktes. Andererseits ist er auch ein opportunistischer Krankheitserreger und gilt als bedeutendster humanpathogener Pilz (Hazan, 1995; Pfaller *et al.*, 1998; Clark und Hajjeh, 2002). Als Bestandteil der normalen Mikroflora auf den Schleimhäuten des Verdauungs- und

Urogenitalsystems kann *C. albicans* bei ca. 70% der gesunden Bevölkerung nachgewiesen werden, ohne dabei dem Organismus zu schaden (Odds, 1988; Ruhnke und Maschmeyer, 2002). Kommt es jedoch zu einer Störung des Gleichgewichtes der natürlichen Flora des Wirtes oder ist das Immunsystem des Wirtes stark supprimiert, wird dieser Kommensale zum Pathogen und kann zu lokalen bis hin zu schweren systemischen Infektionen führen. Zu den lokalen, meist oberflächlichen Infektionen gehören jene an den Schleimhäuten der Mundhöhle, des Ösophagus und der Vagina (Fidel *et al.*; 1999). Etwa 90% der Patienten mit fortgeschrittener HIV-Infektion oder bei immunsupprimierten Tumorpatienten, die mit Chemotherapie behandelt werden, entwickelt sich durch *C. albicans* eine oropharyngeale Candidiasis, welche als „Mundsoor“ bekannt ist und in den seltenen Fällen andere Schleimhäute infiziert bzw. zu einer systemischen Infektion führt. Zudem weiß man heute, dass ca. 75% aller Frauen mindestens ein Mal in ihrem Leben unter einer vaginalen Candidose leiden (Sobel, 1992; Samaranayake, 1993; Fidel *et al.*; 1999; Dalle *et al.*, 2010). Eine systemische *C. albicans*-Infektion entwickelt sich, wenn *Candida*-Zellen von kolonisierten Epithelien (z. B. der Darmschleimhaut) über Penetration und Gewebszerstörung in die Blutbahn gelangen und sich so in anderen Organen ausbreiten. Solche invasiven Organmykosen, wie zum Beispiel in Leber, Niere, Herz, Nervensystem oder Lunge, können im schlimmsten Fall sogar zu einer Sepsis führen (Odds 1994; Engelmann, 1999; Koh *et al.*, 2008). Besonders gefährdet für invasive Systemmykosen sind neben Krebspatienten auch immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantation (Engelmann, 1999; Martin *et al.*, 2003).

Es gibt heute verschiedene Wirkstoffe die zur Behandlung von *C. albicans*-Infektionen eingesetzt werden. Die Anzahl geeigneter Antimykotika ist jedoch begrenzt, da Pilze als Eukaryoten zellbiologische Gemeinsamkeiten mit dem Wirt aufweisen. Zusätzlich gibt es dadurch auch nur eine beschränkte Zahl spezifischer Angriffspunkte für Medikamente. Man unterscheidet die einzelnen Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Wirkung bzw. Angriffspunkte auf verschiedene Mechanismen in der Pilzzelle. Amphotericin B beispielsweise gehört zur Stoffgruppe der Polyene und stört durch Bindung an Ergosterol die Membranfunktion der Pilzzelle. Azole (z. B. Fluconazol) und Allyamine (z. B. Terbinafin) inhibieren die Biosynthese des Ergosterols. Durch eine Veränderung in der Lipidzusammensetzung kommt es schließlich zu einer Änderung der Membranpermeabilität und damit zum Funktionsverlust der Plasmamembran (Mysiakina *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 1985). Eine andere Stoffklasse die jedoch seltener verwendet wird, sind die Fluoropyrimidine (z. B. 5-Flucytosin). Diese greifen in die DNA-Synthese

und den RNA-Metabolismus ein (Georgopapadakou, 1998). Zur Gruppe der Echinocandine gehört u.a. Caspofungin, welches die β -(1,3)-Glukan-Synthese inhibiert und somit den Aufbau einer intakten Zellwand stört (Gubbins und Heldenbrand, 2010; Glöckner, 2011).

Neben starken Nebenwirkungen stellen die zunehmenden Resistenzen gegen einige der eingesetzten Antimykotika ein weiteres Problem bei der Behandlung von *Candida*-Infektionen dar. Daher ist es unerlässlich weiterhin nach neuen und besseren Wirkstoffen zu suchen, die auf grundlegende biologische Prozesse und/oder pathogene Faktoren von *C. albicans* zielen.

1.2.1 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

C. albicans verfügt über verschiedene Eigenschaften, welche für seine Virulenz von Bedeutung sind. Man vermutet, dass diese dem Pilz die Möglichkeit verleihen, sich durch ein aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel bei entsprechender Disposition an verschiedene Wirtsnischen anzupassen, sich zu vermehren und auszubreiten (Navarro-Garcia *et al.*, 2000). Zu den am meisten untersuchten Virulenzfaktoren von *C. albicans* gehören die Fähigkeit zur Adhärenz an verschiedenste Wirtsoberflächen, die Sekretion hydrolytischer Enzyme (z. B. sekretorische Aspartatproteasen und Phospholipasen) und das di- bzw. polymorphe Wachstum, speziell mit der Fähigkeit zur Hyphenbildung (Odds, 1994; Calderone und Fonzi, 2001).

Die Pathogenese von *C. albicans*-Infektionen ist ein komplexer Prozess, der zunächst mit der Adhäsion an Epithelzellen des Wirtsorganismus beginnt, gefolgt von einer Penetration des Wirtsgewebes mit schließlicher Invasion und Schädigung von Gewebe. Für die Adhäsion der *C. albicans*-Zellen sind Oberflächenproteine (Adhäsine) der Zellwand, wie z. B. Als3 und Hwp1 von großer Bedeutung (Hoyer 2001; Nobile *et al.*, 2006). *HWP1* (hyphal wall protein) wird hyphenspezifisch exprimiert und ist über einen GPI- (Glycosylphosphatidylinisitol)-Anker an das β -Glukan der Zellwand gebunden (Staab und Sundstrom 1998). Der N-Terminus dieses Proteins dient den Transglutaminasen der Wirtszellen als Substrat, wodurch Hyphenzellen von *C. albicans* kovalent an Epithelzellen des Wirtes binden können und somit die Penetration des Gewebes eingeleitet wird (Staab *et al.*, 1999; Sundstrom *et al.*, 2002). *ALS3* gehört, neben sieben weiteren Genen, zur ALS (agglutinin-like sequence)-Familie, die für Zellwandglykoproteine kodieren und von *C. albicans* während der Infektion differentiell reguliert werden (Hoyer 2001). *ALS3*

fungiert als Invasin, in dem es durch Bindung an Zellrezeptoren des Wirtes seine eigene Endozytose einleitet (Phan *et al.*, 2007; Liu und Filler, 2011; Wächtler *et al.*, 2011). Dieser Vorgang wird als induzierte Endozytose bezeichnet, bei dem *C. albicans* die Wirtszelle stimuliert, so dass diese den Pilz umfließt und in sich aufnimmt (Phan *et al.*, 2007). Des Weiteren besitzt *C. albicans* die Fähigkeit zur aktiven Penetration in Epithelzellen des Wirtes. Dabei ermöglichen die Sekretion proteolytischer und lipolytischer Enzyme sowie die physikalischen Kräfte der Hyphen das Eindringen in die Wirtszelle (Gow *et al.*, 2002; Naglik *et al.*, 2003).

Die Sekretion solch hydrolytischer Enzyme ist ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans*. Als proteolytische Enzyme sind besonders die sekretorischen Aspartatproteasen (SAPs) zu erwähnen. Die Genfamilie umfasst in *C. albicans* zehn Mitglieder, die mit *SAP1-SAP10* bezeichnet werden (Monod *et al.*, 1994; Hube *et al.*, 2004; Monod *et al.*, 1998). Diese Enzyme spielen vermutlich nicht nur bei der Nährstoffbereitstellung eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Adhäsion und Invasion von *C. albicans* an bzw. in Wirtsgewebe (Morschhäuser *et al.*, 1997). Die Proteasen Sap4, Sap5 und Sap6 beispielsweise werden während des Hyphenwachstums gebildet und sind bei der Zerstörung von Zellwandproteinen beteiligt, was dem Pilz schließlich erleichtert tiefere Gewebsschichten zu penetrieren (Morschhäuser *et al.*, 1997; Naglik *et al.*, 2003).

Dalle *et al.* zeigten zudem, dass der Zelltyp und das Stadium seiner Differenzierung einen Einfluss auf die Art des Mechanismus haben, mit der *C. albicans* in die Zelle eindringt. In orale Epithelzellen konnte der Pilz sowohl mittels aktiver Penetration als auch über induzierte Endozytose eindringen. Eine Invasion in intestinale Zellen wurde hingegen nur über aktive Penetration beobachtet (Dalle *et al.*, 2010). Eine Invasion in das Wirtsgewebe erfolgt letztlich jedoch stets durch ein Zusammenspiel von Kontakterkennung, aktiver Penetration, gerichteter Hyphenausbildung und der Expression von Pathogenitätsfaktoren für die interepitheliale Invasion, Ausbreitung und schließlicher Schädigung der Wirtszelle (Schaller *et al.*, 2005; Wächtler *et al.*, 2011).

Neben den Pathogenitätsfaktoren eines Mikroorganismus spielt auch die Assimilation von essentiellen Nährstoffen aus dem Wirt einen wesentlichen Aspekt im Prozess der Infektion. Der Wirtsorganismus ist daher bestrebt den Zugang der Mikroorganismen zu solchen Nährstoffen zu drosseln bzw. zu behindern. Dieser Vorgang wird als „nutritional immunity“ bezeichnet. In diesem Zusammenhang wurde der Mechanismus der Eisen-Sequestrierung zusammen mit Strategien die pathogene Mikroorganismen einsetzen, um diese Restriktion zu überwinden, bereits umfangreich untersucht (Kehl-Fie und Skaar,

2010; Skaar, 2010; Citiulo *et al.*, 2012). Das zweite meist vorhandene Spurenelement in Wirbeltieren ist Zink, wobei im Vergleich zu Eisen über die mikrobiellen Mechanismen der Zinkakquise weniger bekannt ist. Zink ist ein essentieller Nährstoff der vielen Wirtsproteinen als struktureller oder katalytischer Cofaktor dient (Bird *et al.*, 2000; Andreini *et al.*, 2009). Dass die Zinkhomöostase eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Entwicklungsfähigkeit von Zellen spielt, beschrieben Bedell und Soll bereits 1979. In ihren Untersuchungen zeigten sie, dass die Konzentration an Zinkionen im Kulturmedium die Hyphenformation von *C. albicans* beeinflusst.

In *S. cerevisiae* spielt der Transkriptionsfaktor Zap1 eine zentrale Rolle bei der Reaktion auf Zinkmangel (Zhao und Eide, 1997). Für viele seiner Zielgene fungiert Zap1 als transkriptioneller Aktivator und erhöht die Expression dieser Gene bei niedrigem Zinkspiegel. Dafür bindet er an die „zink-responsive elements“ (ZREs) in den Promotoren dieser Zielgene (Zhao *et al.*, 1998). Einige der Gene haben die Aufgabe ein ausreichendes Level an zytosolischem Zink zum Zellwachstum aufrecht zu erhalten. Die Gene *ZRT1*, *ZRT2* und *FET4* beispielsweise kodieren für Zinktransporter, die für die Zinkaufnahme über die Plasmamembran verantwortlich sind (Zhao und Eide, 1996a/b; Waters und Eide 2002). *ZRT3* kodiert für ein Membranprotein der Vakuolen, welches für den Transport von gespeichertem Zink aus der Vakuole ins Zytoplasma ermöglicht (Wu *et al.*, 2008). Die Expression von *ZRT1*, *ZRT2* und *ZRT3* ist in zinklimitierten Zellen erhöht und wird bei hohen Zinkkonzentrationen eingestellt (Eide, 2001). Darüber hinaus reguliert Zap1 die Expression seines eigenen Promotors via positiven Autoregulationsmechanismus (Zhao und Eide, 1997). In *C. albicans* kodiert *CSRI* (*Candida* Suppressor of *rok1*) (*orf19.3794/CD36_44490*) für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und ist das Homolog zu *ZAP1* in *S. cerevisiae* (Zhao und Eide, 1997). In Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Deletion von *ZAP1* in *S. cerevisiae* und *CSRI* in *C. albicans* zu einem starken Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen führt und zudem wiesen die *CSRI*-Deletionsmutanten unter hypheninduzierenden Bedingungen einen Defekt im filamentösen Wachstum auf (Bird *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008). Ebenfalls konnte ein Einfluss von *CSRI/ZAP1* auf die Matrixproduktion in Biofilmen gezeigt werden bzw. kontrolliert *CSRI* die Expression von verschiedenen Genen die wichtig für die Matrixformation in *C. albicans* sind (Nobile *et al.*, 2009).

1.2.2 Polymorphismus als wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans*

Neben der Adhäsion an und Invasion in Epithelzellen des Wirtes, der Sekretion proteolytischer und lipolytischer Enzyme und der damit verbundenen Gewebsschädigung, besitzt *C. albicans* die Eigenschaft des Polymorphismus. Diese Fähigkeit wird als wichtiger Aspekt seiner Virulenz angesehen und ermöglicht die reversible Umwandlung von morphologischen Strukturen in Abhängigkeit von Umweltbedingungen (Saville *et al.*, 2003). Man unterscheidet zwischen Hefezellen, Pseudohyphen, echten Hyphen, Chlamydosporen und zusätzlich zwischen dem „white“- und „opaque“-Phänotyp.

Die Fähigkeit von *C. albicans* zwischen der einzelligen Hefeform und dem mehrzelligen filamentösen Wachstum zu wechseln, wird als Dimorphismus bezeichnet (Odds, 1988). Die rund-ovale Hefeform, die als Blastospore (Blastokonidie) bezeichnet wird, trennt sich nach Knospung einer Tochterzelle durch Abschnürung von der Mutterzelle vollständig (Berman und Sudbery, 2002). Zudem bildet *C. albicans* auch Filamente in Form von Pseudohyphen und echten Hyphen aus. Pseudohyphen bestehen aus kettenartig aneinanderhängenden Blastokonidien, deren Verlängerung durch wiederholte unipolare Knospung erfolgt. Dabei bleiben die Zellen an der Knospungsstelle miteinander verbunden und zwischen den Zellen sind Septen mit deutlichen Einschnürungen zu erkennen (Braun und Johnson, 1997; Sudbery *et al.*, 2004). Echte Hyphen sind röhrenförmige, lange und hoch polarisierte Zellen, wobei die Kompartimente durch Septen voneinander getrennt sind, jedoch keine Einschnürungen erkennbar sind. Sie entstehen durch das kontinuierliche apikale Wachstum eines Keimschlauches (Braun und Johnson, 1997; Berman und Sudbery, 2002).

Neben der Transition von Hefezelle zur Hyphe gibt es einen weiteren morphologischen Wechsel in *C. albicans*, das sogenannte white-opaque-Switching. Dieser Vorgang wurde erstmals bei dem klinischen Isolat WO-1 beobachtet (Slutsky *et al.*, 1987), der seitdem als experimentelles Model zur Erforschung dieses Phänomens verwendet wird. Es kommt dabei zum Wechsel zwischen normalen rund-ovalen Hefezellen mit glatter Oberfläche und langgestreckten asymmetrischen Hefezellen mit charakteristischen Auswölbungen auf der Oberfläche, auch „Pimples“ genannt (Anderson und Soll 1987; Slutsky *et al.* 1987). White-opaque-Switching tritt mit einer Frequenz von 10^{-3} auf, ist spontan, reversibel und wurde nach dem Erscheinungsbild der halbkugelförmigen weißen (white) bzw. flachen, dunkleren (opaque) Kolonien auf Agarplatten benannt, die durch die beiden Zelltypen hervorgerufen werden (Slutsky *et al.*, 1987). Des Weiteren geht es mit einer differentiellen Expression

von white-Phasen-spezifischen und opaque-spezifischen Genen einher (Morrow *et al.* 1992, 1993; Srikantha und Soll 1993). Mit der Entdeckung des Matings in *C. albicans* kam es zu einer neuen biologischen Bedeutung des white-opaque-Switchings. Hull und Johnson identifizierten 1999 einen **mating type like**-Lokus (*MTL*) im Genom von *C. albicans*, der homolog zum *MAT*-Lokus von *S. cerevisiae* ist. Zusätzlich enthält *C. albicans* Gene, die den mating-type (*MAT*) Genen *MATa1*, *MATa1* und *MATa2* von *S. cerevisiae* entsprechen. Beim Mating in *S. cerevisiae* von **a**- und α -Zellen entstehen diploide, heterozygote **a**/ α -Zellen, die über einen Repressorkomplex aus **a1** und $\alpha2$ das Mating reprimieren. Die meisten *C. albicans*-Stämme sind im *MTL*-Lokus heterozygot und es findet kein Mating statt. Es konnten allerdings künstlich Stämme hergestellt werden, die homozygot für *MTLa* oder *MTLa* sind. Das Mating zwischen solchen künstlich hergestellten *MTLa*- oder *MTLa*-Stämmen weist jedoch eine niedrige Effizienz auf (Frequenz 10^{-7}) (Magee und Magee; 2000). Dies erklärt sich dadurch, dass das Mating in *C. albicans* zusätzlich über das white-opaque-Switching reguliert wird und lediglich opaque-Zellen die Mating-kompetente Form von *C. albicans* sind (Miller *et al.*, 2002). Der Stamm WO-1 ist im *MTLa*-Lokus homozygot, was dessen Fähigkeit zum white-opaque-Switching erklärt (Lockhart *et al.*, 2002; Miller und Johnson, 2002). Wenn man *C. albicans* während des Matings mikroskopisch beobachtet, erkennt man eine Kommunikation der *MTLa*- und *MTLa*-Zellen miteinander über ein Pheromonsignal. Dieses Signal wird in das Zellinnere über den MAPK-Signalweg geleitet.

Da die Chlamydospore für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung ist, wird in einem separaten Kapitel detailliert darauf eingegangen.

1.2.3 Regulation des Polymorphismus in *C. albicans*

Die Fähigkeit von *C. albicans* seine Morphologie zu verändern und sich an verschiedenste Umweltbedingungen anzupassen, sichert das Überleben bzw. die Ausbreitung in einer Vielzahl anatomischer Nischen (Braun und Johnson, 1997). Beispielsweise ist *C. albicans* in der Lage auf verschiedene pH-Bedingungen der Umwelt zu reagieren, was für die Virulenz des Pilzes von großer Bedeutung ist. Man weiß heute, dass der morphologische Wechsel von der Hefeform zur Hyphe erheblich durch den pH-Wert des Kulturmediums beeinflusst wird (Buffo *et al.* 1984; Fonzi, 2002). *C. albicans* liegt bei $\text{pH} \leq 6,5$ in seiner Hefeform vor und bildet mit steigendem pH-Wert Filamente aus (Fonzi, 2002).

Weitere Faktoren, die die Hefe-Hyphe Transition über verschiedene Signaltransduktionswege induzieren, sind z. B. erhöhte Temperatur (37°C), Gegenwart von

Serum, Stickstoff- oder Kohlenstoffmangel, Mangel an Sauerstoff (hypoxische Bedingungen) sowie Inkubation bei 5% CO₂ (Braun und Johnson, 1997; Klengel *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2007).

Mit dem Ziel den Dimorphismus und somit den Übergang von der Hefe- in die Hyphenform besser verstehen zu können, wurden die zugrundeliegenden regulatorischen Zusammenhänge intensiv erforscht. Mit der Veränderung der Morphologie verbunden ist die Expression hyphenassoziierter Gene (z. B. *ALS3*, *HWPI*, *SAP4* bis *SAP6*), die signalspezifisch über verschiedene Signaltransduktionswege reguliert werden. Als komplexes Netzwerk, in dem verschiedene, zum Teil auch unabhängige, Wege direkt miteinander verknüpft sind oder zusammenwirken, wird es *C. albicans* so ermöglicht, in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen, differentiell Gene zu exprimieren sowie die Expression wichtiger Virulenzfaktoren zu sichern (Brown und Gow, 1999; Lane *et al.*, 2001a; Liu, 2001; Brown *et al.*, 2007).

In *C. albicans* stellen der mitogenaktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Weg, der cAMP-abhängige Proteinkinase A- (PKA-) Weg und der pH-abhängige Signalweg die Hauptaktivierungswege des filamentösen Wachstums dar (Brown und Gow, 1999; Biswas *et al.*, 2007). Der cAMP- und MAPK-Signalweg werden zum Teil über gleiche Faktoren aktiviert (Abbildung 1). Dazu gehört beispielsweise die Ammoniumpermease Mep2, die durch Stickstoffmangel induziert, Ras1-abhängig wirksam ist (Biswas und Morschhäuser, 2005). Die MAPK-Kaskade wird zudem durch den Einfluss von Serum und einer Temperaturerhöhung auf 37°C induziert und vermittelt über eine Reihe von Phosphorylierungsschritten in *C. albicans* die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Cph1, der homolog zum *Saccharomyces cerevisiae* Transkriptionsfaktor Ste12 ist (Sudbery, 2011). Die Gene *STE11*, *HST7* und *CEK1/CEK2* repräsentieren dabei die MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), MAPK-Kinase (MAPKK) und MAPK welche dem Transkriptionsfaktor Cph1 vorgeschaltet sind (Shapiro *et al.*, 2011). Dieser Kaskade vorgeschaltet ist die p21-aktivierte Kinase Cst20, die über Ras1 aktiviert wird (Liu, 2001). Eine Deletion von *STE12* in *S. cerevisiae* führte zu Defekten im Mating-Prozess und in der Ausbildung von Pseudohyphen, in *C. albicans* hingegen führte die Deletion von *CPH1* nur unter spezifischen Wachstumsbedingungen, wie Stickstoffmangel, zu einer Störung der Hyphenbildung. Die Deletionsmutanten bildeten statt echter Hyphen Pseudohyphen aus (Liu *et al.*, 1994; Csank *et al.*, 1998; Brown und Gow, 1999).

Eine weitere wichtige Rolle für die Hyphenbildung in *C. albicans* spielt der Transkriptionsfaktor Efg1, der den cAMP-abhängigen Signalweg reguliert. Dieser

Signalweg wird häufig als der bedeutendere Weg angesehen, da die meisten Mutanten dieses Weges einen Defekt der Hyphenbildung zeigen. So wiesen *efg1Δ*-Mutanten *in vitro* in Gegenwart von Serum einen starken Defekt in der Hyphenbildung auf, zudem war die Virulenz im Tiermodell deutlich vermindert. Die Fähigkeit zur Hyphenbildung war allerdings in der *cph1Δ-efg1Δ*-Doppelmutante unter dieser Bedingung vollständig verloren und sie verhielten sich im Infektionsmodell avirulent, was die Bedeutung beider Signalwege verdeutlicht (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Maidan *et al.*, 2005). Der cAMP-Signalweg wird neben der Stickstofflimitierung auch durch CO₂ und die Gegenwart von Serum induziert (Sudbery, 2011). Die Signalübertragung verläuft dabei wie bei der MAPK-Kaskade von der Zelloberfläche indirekt über Ras1 oder auch direkt über eine Aktivierung der Adenylcyclase Cyr1, wodurch der cAMP-Spiegel der Zelle ansteigt (Abbildung 1). Dadurch wird ein Proteinkomplex aktiviert, der aus den katalytischen Untereinheiten Tpk1 und Tpk2 sowie der regulierenden Untereinheit Bcy1 besteht und schließlich den Transkriptionsfaktor Efg1 aktiviert, welcher die Expression hyphenassoziierter Gene reguliert (Shapiro *et al.*, 2011).

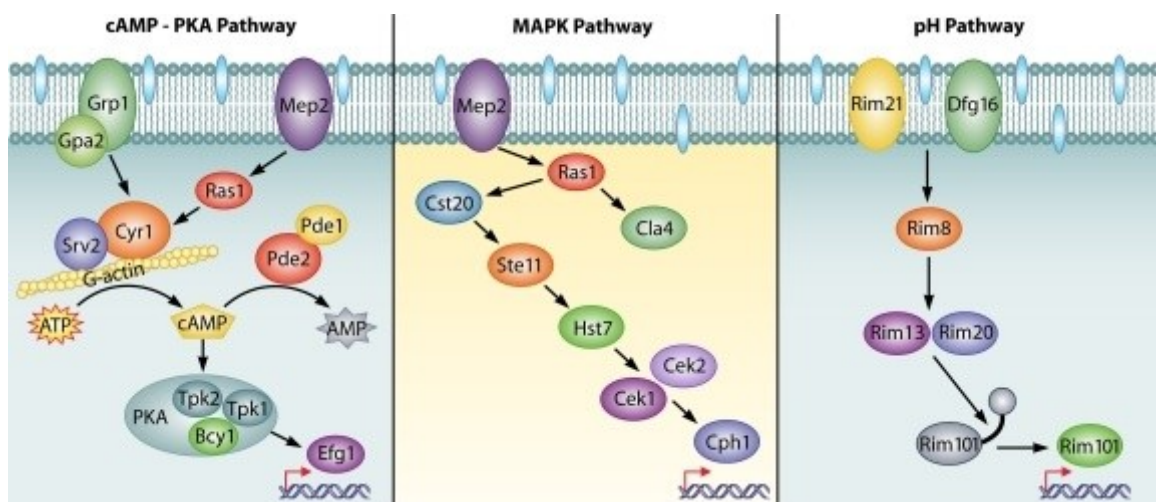


Abb. 1: Signaltransduktionswege für die Regulation der Morphogenese in *C. albicans*. (Abbildung übernommen aus Shapiro *et al.*, 2011)

Als zentraler Regulator ist Efg1 in *C. albicans* an vielen verschiedenen Prozessen beteiligt. Neben seiner Rolle in der Regulation der Morphogenese, reguliert er u. a. auch die hyphenspezifischen Zellwandproteine und Virulenzfaktoren Hwp1 und Hwp2 sowie das hefespezifische Zellwandprotein Ywp1 (Sohn *et al.*, 2003).

Der pH-induzierte Transkriptionsweg läuft über den Transkriptionsfaktor Rim101. Dabei wird der pH-Wert durch die Plasmamembranproteine Rim21 und Dfg16 erkannt. Bei neutral-alkalischem pH-Wert werden diese Proteine stimuliert und somit das Rim21-

assoziierte Protein Rim8 ubiquitiniert, welches eine Endozytose einleitet (Davis, 2009). Über die Rekrutierung von Rim13 und Rim20 kommt es schließlich zur Aktivierung von Rim101. Die aktive Form von Rim101 wandert in den Zellkern und über die Regulation der Transkription verschiedener Gene (u. a. hyphenspezifischer Gene) wird eine pH-vermittelte Antwort eingeleitet (Liu, 2001; Davis, 2009; Shapiro *et al.*, 2011; Sudbery, 2011).

Neben den hyphenspezifischen Transkriptionsfaktoren wie z. B. Efg1, konnten auch Repressoren des Hyphenwachstums identifiziert werden. Der transkriptionelle Korepressor Tup1 bildet zusammen mit Nrg1 und Rfg1 Repressorkomplexe, die letztlich die Expression hyphenassoziierter Gene, wie zum Beispiel *ALS3*, *ALS8*, *ECE1* und *HWP1*, supprimieren (Braun und Johnson, 1997; Murad *et al.*, 2000a; Kadosh und Johnson, 2001). Eine Deletion der Gene *TUP1* oder *NRG1* führte zu konstitutiv filamentösem Wachstum (Braun und Johnson, 1997; Murad *et al.*, 2000a). Darüber hinaus kann Nrg1 auch Tup1-unabhängig verschiedene hyphenassozierte Gene regulieren (Murad *et al.*, 2001b). Bereits 2001 zeigten Braun *et al.* und Murad *et al.* unabhängig voneinander, dass es beim Wachstum von *C. albicans* in Serum und bei 37°C zu einer Reduktion der *NRG1* mRNA kommt. In kürzlich publizierten Daten wurde beobachtet, dass Nrg1 während der Hypheninduktion von den Promotoren hyphenassoziierter Gene dissoziiert und während der Ausbildung von Hyphen lediglich in geringen Mengen erhalten bleibt. Dadurch kommt es zu einer Derepression von hyphenspezifischen Genen und schließlich zum morphologischen Wechsel von der Hefeform in die filamentöse Wuchsform (Lu *et al.*, 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Histondeacetylase Hda1 bei niedrigem Nrg1-Gehalt zu den Promotoren hyphenspezifischer Gene rekrutiert wird, dort zu einer Veränderung des Promotor-Chromatins führt, wodurch schließlich Nrg1 nicht mehr binden kann und es somit zur Ausbildung von Filamenten kommt (Lu *et al.*, 2011).

Zudem ist der Transkriptionsfaktor Nrg1 ein bedeutender Repressor der Chlamydosporenbildung und wird in diesem Zusammenhang genauer beschrieben.

1.3 *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis wurde erstmals 1995 als eigenständige Spezies von der Arbeitsgruppe um D. C. Coleman in Dublin beschrieben (Sullivan *et al.*, 1995). Zuvor wurde *C. dubliniensis* aufgrund enger Verwandtschaft und seiner phänotypischen Ähnlichkeit zu *C. albicans* als atypischer Stamm dieser Spezies betrachtet. Durch genaue

phänotypische und genetische Untersuchungen gelangen es Sullivan *et al.* aus einer Gruppe solch atypischer *C. albicans*-Stämme schließlich *C. dubliniensis* als eigenständige Spezies zu identifizieren und nach dem Ort der Erstbestimmung zu benennen (Sullivan *et al.*, 1995).

C. dubliniensis zählt zu den nächsten Verwandten von *C. albicans*. Ein Vergleich der Genomsequenz beider Spezies ergab, dass von den 5569 orthologen Genpaaren 44,4% (2470) auf Nukleotidebene eine über > 90%ige Sequenzhomologie aufzeigten und 96,3% (5362) zu mehr als 80% identisch waren (Jackson *et al.*, 2009). Zudem zeigte sich bei diesem Vergleich, dass es 29 *C. dubliniensis*-spezifische Gene und 168 *C. albicans*-spezifische Gene gibt. Die Mehrheit der Unterschiede zwischen den beiden Spezies begründet sich in der hohen Anzahl an Genfamilien bzw. dessen Umfangs in *C. albicans*, von denen viele virulenz-assoziiert sind (Moran *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2009). Vor allem fehlen im Genom von *C. dubliniensis* Gene, die für hyphenspezifische Proteine bzw. Virulenzfaktoren kodieren. Dazu gehören die Zelloberflächenproteine Hyr1 und Als3 sowie Hwp1, welches eine hohe Divergenz aufweist (Moran *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2009). Des Weiteren zeigte sich, dass es nur sieben homologe *SAP*-Gene im Genom von *C. dubliniensis* gibt. Die Gene *SAP4*, *SAP5* und *SAP6* auf dem Chromosom 6 sind in *C. albicans* sehr nah verwandt, wohingegen *C. dubliniensis* mit *CdSAP4-6* nur ein orthologes Gen dieser Unterfamilie besitzt. Es wird vermutet, dass bei *C. albicans* während der evolutionären Weiterentwicklung aufgrund eines Anpassungsprozesses, das ursprüngliche *CdSAP4-6* Gen zwei unabhängige Duplikationen sowie einen Teilinversionsprozess auf der entsprechenden Genregion des Chromosoms 6 durchlaufen hat, wobei sich weitere funktionelle Proteine gebildet haben (Jackson *et al.*, 2009, Moran *et al.*, 2011).

Den größten Unterschied hinsichtlich der vorhandenen Genfamiliengröße gibt es jedoch bei der **Telomer-assoziierten-Familie** (TLO-Familie), welche in *C. albicans* 14 Gene, in *C. dubliniensis* jedoch nur zwei Gene umfasst. Diese Gene kodieren für Transkriptionsregulatoren. Phänotypische Analysen der *C. dubliniensis* *tloΔ*-Mutanten wiesen darauf hin, dass diese Gene eine Rolle in der Kontrolle der Hyphenbildung spielen könnten (Jackson *et al.*, 2009). Zudem gibt es eine Reihe von Genen, die in *C. dubliniensis* nicht vertreten sind bzw. gibt es 78 Pseudogene in *C. dubliniensis* mit intakten Orthologen in *C. albicans* (Uhl *et al.*, 2003).

Neben der nahen phylogenetischen Verwandtschaft zeigen beide *Candida*-Arten auch viele phänotypische Gemeinsamkeiten auf, die früher oft als charakteristische Eigenschaften von

C. albicans angesehen wurden. Unterschiede sind jedoch in der Pathogenität beider Spezies zu sehen. Während *C. albicans* in fast 50% der Fälle als Auslöser systemischer Candidosen gilt, ist *C. dubliniensis* eher selten mit hämatogenen Infektionen assoziiert und kann lediglich in 2-3% aus Blutproben isoliert werden (Kibbler, *et al.*, 2003; Odds, *et al.*, 2007). Als Hauptisolationsort von *C. dubliniensis* gilt die Mundhöhle HIV-infizierter Patienten. Im Spätstadium beherbergen etwa 17% aller HIV-Patienten *C. dubliniensis* mindestens als Bestandteil einer Mischkultur, bei positivem Hefenachweis erhöhte sich der Anteil auf 30% (Kirckpatrick *et al.*, 1998; Sullivan und Coleman 1998; Kurzai *et al.*, 1999). Jedoch konnte *C. dubliniensis* auch bei gesunden, nicht HIV-infizierten Patienten nachgewiesen werden, was zeigt, dass der Nachweis von *C. dubliniensis* nicht notwendigerweise mit einer klinisch manifesten oropharyngealen Candidose (OPC) einhergeht.

Obwohl in Studien bereits gezeigt werden konnte, dass *C. dubliniensis* gegenüber demselben antimykotischem Spektrum empfindlich ist wie *C. albicans*, wurde auch von klinischen fluconazolresistenten Isolaten berichtet (Moran *et al.*, 1997; Scheid *et al.*, 2012). Generell sind jedoch Angaben zur Antimykotikaempfindlichkeit schwer zu interpretieren, da es nur geringe Mengen an untersuchten Isolaten gibt und somit angegebene Prozentangaben nicht sicher repräsentativ sind (Jabra-Rizk *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000; Quindos *et al.*, 2000). Moran *et al.* beispielsweise untersuchten in einer Studie die Empfindlichkeit von 20 *C. dubliniensis*-Isolaten gegenüber Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol und Amphotericin B. Die Isolate stammten sowohl von HIV-positiven als auch HIV-negativen Patienten. Sie beobachteten, dass die Mehrheit (80%) der Isolate empfindlich hinsichtlich der getesteten, für gewöhnlich verwendeten antifungalen Agenzien, einschließlich Fluconazol, waren. Einige der Isolate HIV-infizierter Patienten zeigten nach vorangegangener Fluconazoltherapie eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber diesem Wirkstoff. Zudem zeigten sie, dass eine Fluconazolresistenz in *C. dubliniensis*, im Gegensatz zu *C. albicans*, durch langsam steigende Fluconazolkonzentrationen im Medium *in vitro* hervorgerufen werden konnte (Moran *et al.*, 1997, 1998). Dem liegt eine verstärkte Expression von „Multidrug-Transporter“-Genen, speziell *MDR1* zugrunde. Diese kommen auch bei *C. albicans* vor und sorgen für einen aktiven Efflux des Antimykotikums (Moran *et al.*, 1998; Wirsching *et al.*, 2001; Morschhäuser *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2008). Die Fluconazolresistenzen scheinen jedoch in der Klinik von geringerer Bedeutung zu sein. Die Rate an fluconazolresistenten Isolaten nach vorheriger Therapie mit Fluconazol müsste sonst weitaus höher liegen und

würde in Form von Therapieversagen in Erscheinung treten. In einer Fallstudie zeigte sich, dass bei einem HIV-Patienten mit einer Langzeit-Fluconazoltherapie, bei erhöhter Dosis, der lange kolonisierende *C. dubliniensis*-Stamm aus den Isolaten verschwand, wohingegen der *C. albicans*-Stamm weiter nachzuweisen war (Ruhnke *et al.*, 2000).

1.3.1 Phänotypische Merkmale

C. dubliniensis ist ein dimorpher Hefepilz, der neben *C. albicans* bis dato als einzige Spezies der Gattung *Candida* in der Lage ist Keimschläuche und Chlamydosporen zu bilden. Unter normalen Laborbedingungen wächst er als Sprosszelle und kann, ebenfalls wie *C. albicans*, bei Änderungen der Kultivierungsbedingungen wie der Zugabe von Serum, Erhöhung der Temperatur oder des pH-Wertes in ein filamentöses Wachstum übergehen. Allerdings ist die Keimschlauchbildung in *C. dubliniensis* deutlich langsamer (Coleman *et al.*, 1997). Eine Inkubation auf Reisextrakt-Agar (2-3 d; 25°C) unter mikroaerophilen Bedingungen führt zur Ausbildung von Chlamydosporen (Sullivan *et al.*, 1995; Sonneborn *et al.*, 1999). Zudem ist *C. dubliniensis* in der Lage auf Staib-Agar ebenfalls Chlamydosporen zu entwickeln, während *C. albicans* glatte Kolonien aus Hefezellen formt (Staib und Morschhäuser, 1999). Bis heute gibt es eine Reihe weiterer Festmedien die zur Differenzierung genutzt werden können. Dazu gehört beispielsweise DRBC-Agar (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol-Agar) auf dem *C. dubliniensis* raue Kolonien mit peripheren Hyphen und zahlreichen Chlamydosporen bildet, während *C. albicans* glatte Kolonien ohne Chlamydosporen formt (Scheid *et al.*, 2010). Ebenfalls ist Rosmarinextrakt-Agar, Oreganoextrakt-Agar, Sonnenblumensamen-Agar und Casein-Agar in diesem Zusammenhang zu nennen (Mosca *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2004; de Loreto *et al.*, 2008).

Als weiteres phänotypisches Merkmal von *C. dubliniensis* ist sein Wachstumsdefizit bei 42°C bis 45°C zu nennen (Sullivan *et al.*, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Sullivan und Coleman 1998). Zwei Indikatormedien zeigen ebenfalls einen Unterschied zwischen *C. dubliniensis* und *C. albicans*. CHROMagar *Candida* ist ein diagnostisches Medium, welches chromogene Substanzen enthält und auf dem verschiedene *Candida*-Spezies aufgrund unterschiedlicher Koloniefärbung voneinander differenziert werden können. *C. dubliniensis*-Kolonien erscheinen in einer dunkelgrünen Färbung, während *C. albicans*-Kolonien hellgrün/blass grün gefärbt werden (Odds und Bernaerts, 1994; Sullivan und Coleman, 1998). Auf Methylblau-Sabouraud-Agar fluoresziert *C. albicans* bei Bestrahlung

mit Woodlicht (langwelliges UV-Licht) gelb, wohingegen *C. dubliniensis* keine Fluoreszenz zeigt (Schoofs *et al.*, 1997).

Biochemisch ist das im Vergleich zu *C. albicans* abweichende Kohlenhydrat-Assimilationsmuster zu nennen, weswegen *C. dubliniensis*-Isolate u. a. zunächst als „atypische *C. albicans*-Stämme/Isolate“ klassifiziert wurden (Sullivan und Coleman, 1998). Die meisten *C. dubliniensis*-Stämme sind nicht in der Lage D-Xylose, α -Methyl-D-Glukosid und DL-Laktat zu assimilieren (Kirkpatrick, 1998; Pincus *et al.*, 1999; Tinteln *et al.*, 2000). Jedoch zeigen die Ergebnisse auch Schwankungen, was zum einen auf die unterschiedlichen Testsysteme und Inkubationsdauern zurückzuführen ist, zum anderen auf eine Variabilität der Assimilationsmuster innerhalb der Spezies (Pincus *et al.*, 1999; Tinteln *et al.*, 2000). Als stabiles biochemisches Merkmal ist hingegen die fehlende Aktivität der intrazellulären β -Glukosidase zu nennen (Sullivan und Coleman, 1998; Kurzai *et al.*, 1999, 2000). Schon vor der Beschreibung von *C. dubliniensis* war bekannt, dass manche der atypischen *C. albicans*-Isolate im Vergleich zu Referenzstämmen keine intrazelluläre β -Glukosidase-Aktivität aufwiesen (Boerlin *et al.*, 1995). Nach der Klassifizierung von *C. dubliniensis* als eigene, neue Spezies konnten solche Isolate dieser zugeordnet werden.

1.3.2 Molekularbiologische Merkmale

Für *C. dubliniensis* findet sich auf Genomebene eine von *C. albicans* deutlich zu unterscheidende Organisation, die für die Klassifizierung als eigene Spezies entscheidend war. Hinsichtlich einer elektrophoretischen Karyotypisierung zeigen sich für *C. dubliniensis* 9-10 unterschiedlich große chromosomale Banden mit mindestens einer unterhalb der Größe von 1 MB, während *C. albicans* nur 7 Banden besitzt, alle größer als 1 MB (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan und Coleman, 1998). DNA Fingerprinting – Sonden (z. B. 27A), die für *C. albicans* verwendet werden oder repetitive Mikrosatellitensequenzen hybridisieren jedoch kaum mit genomischer DNA von *C. dubliniensis* (Morschhäuser *et al.*, 1999a, 2005). Mittels Sequenzanalysen können ebenfalls Unterschiede zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* aufgezeigt werden. Eine Sequenzierung innerhalb der für ribosomale RNA kodierenden DNA Sequenz, wie zum Beispiel der V3-variablen Region im Gen für die 25s rRNA, ergibt identische Ergebnisse innerhalb der Spezies und ist mit 14 – 15 Basenunterschieden deutlich von *C. albicans* zu

unterscheiden (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan und Coleman, 1998). Die Sequenzierung dieser Region gilt bis heute als Goldstandard zur Differenzierung der beiden Spezies.

1.3.3 Identifikation

Die beschriebenen Untersuchungen zum Wachstum bzw. die bekannten phänotypischen Merkmale von *C. dubliniensis* sind alle darauf ausgerichtet, möglichst verlässliche und einfache Differenzierungsmethoden zu finden. Die Färbung auf CHROM-Agar und Fluoreszenz auf Methylblau-Agar, das Wachstum bei 45°C als phänotypische Tests sind allerdings häufig unzuverlässig und führen allenfalls in Kombination zu einer Aussage. Die Anwendung standardisierter biochemischer Testverfahren, wie zum Beispiel das API 20C-System, liefern ebenfalls häufig falsche Ergebnisse. Dies liegt zum einen an dem variablen Kohlenhydratassimilationsmuster von *C. dubliniensis*, zum anderen an der Unterschiedlichkeit der Testsysteme, Inkubationsdauern und unzureichenden Anpassung der Datenbanken (Kirkpatrick, 1998; Pincus *et al.*, 1999). Die Bestimmung der intrazellulären β -Glukosidase-Aktivität erscheint dagegen genauer, da sie bei fast keinem *C. dubliniensis*-Isolat nachweisbar ist (Boerlin *et al.*, 1995; Kurzai *et al.*, 1999).

Es existieren auch PCR-Verfahren zur Speziesidentifizierung, wobei dafür sowie für die anderen beschriebenen genotypischen Analysen in den meisten Routinelabors die nötigen technischen Voraussetzungen fehlen (Kurzai *et al.*, 1999; 2000). Zudem sind diese Verfahren in der Diagnostik sehr aufwendig und kostenintensiv.

Wie bereits erwähnt, ist die Bildung von Chlamydosporen für *C. albicans* und *C. dubliniensis* spezies-spezifisch. Neben der Bedeutung in der mykologischen Diagnostik bzw. zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*, kennt man bis heute weder die biologische Funktion der Chlamydospore, noch ist die genetische Regulation geklärt. Zudem ist es bisher nicht gelungen Proteine zu identifizieren, die spezifisch für Chlamydosporen sind und somit als Marker genutzt werden könnten. Solche Marker könnten zum einen in der Diagnostik zum Einsatz kommen, zum anderen hilfreich für zukünftige Untersuchungen zur morphogenetischen Entwicklung der Chlamydospore sein. Im Folgenden wird detailliert auf die morphologische Form Chlamydospore eingegangen.

1.4 Chlamydosporen

Chlamydosporen sind dickwandige, lichtbrechende und kugelförmige Strukturen, die auf verschiedenen nährstoffarmen Medien gebildet werden. Im Gegensatz zu Hyphen wurden Chlamydosporen kaum während einer Infektion beobachtet und bis heute gibt es keine Hinweise, dass diese morphologischen Strukturen eine Rolle für die Pathogenität von *C. albicans* spielen (Chabasse *et al.*, 1988; Cole *et al.*, 1991).

1.4.1 Definition

Der Name Chlamydospore leitet sich von dem griechischen Wort „chlamys“ ab, was so viel wie Mantel oder Jacke bedeutet und sich auf die massive Zellwand bezieht. Der Name wird jedoch nicht nur für Chlamydosporen in *C. albicans*, sondern auch zur Beschreibung ähnlicher morphologischer Strukturen in anderen Pilzen wie z. B. Dermatophyten, *Cryptococcus neoformans* und anderen dimorphen Pilzen verwendet (Miyaji und Nishimura, 1977; Simon und Galgoczy, 1986; Lin und Heitmann, 2005).

Chlamydosporen sind als asexuelle Sporen beschrieben, die sich als Abrundungen von Zellen terminal oder interkalar formen (Ainsworth, 1961). Sie sind drei bis vier Mal größer als typische Hefezellen von *C. albicans* und enthalten zahlreiche Lipidtropfen und hohe Mengen an RNA, wobei man nicht weiß, welche Bedeutung das für die Zelle hat. Der Name Chlamydospore impliziert das Vorhandensein von Eigenschaften, die mit Überdauerungsformen, Sporen an sich und auch der (Über-)Lebensfähigkeit bzw. Resistenz gegenüber rauen Umweltbedingungen einhergehen (Bakerspiegel und Burk, 1974). Bis heute konnte dies aber nicht bestätigt bzw. überprüft werden (Staib und Morschhäuser, 2007).

1.4.2 Diagnostischer Wert und chlamydosporeninduzierende Medien

Chlamydosporen entwickeln sich bevorzugt während des Wachstums auf nährstoffarmen Medien, welche häufig mit Zusätzen wie Tween 80 supplementiert sind. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur, unter mikroaerophilen Bedingungen und in Dunkelheit (Hayes 1966; Kapica *et al.*, 1969). Die Chlamydosporenentwicklung findet in der Regel an den Enden von Hyphen oder Pseudohyphen, in den meisten Fällen jedoch an der Spitze von sogenannten Suspensorzellen statt. Das sind verlängerte Amphoren-ähnliche Zellen, die sich an filamentösen Zellen verzweigen (Kreger-van Rij, 1984; Odds, 1988). Neben der

Zusammensetzung der Wachstumsmedien zur Induktion der Chlamydosporenbildung spielen auch andere Umweltfaktoren bzw. -bedingungen eine Rolle. Abgesehen von Temperatur, Helligkeit, Feuchtigkeit und der Glukose- und Sauerstoffkonzentration ist auch das Alter der Kultur von Bedeutung (Janson und Nickerson, 1970b; Dujardin *et al.*, 1980a/b).

Reisextrakt-Agar und Maismehl-Agar (Cornmeal) gehören zu den bekanntesten chlamydosporeninduzierenden Medien (Bernhardt, 1946; Sullivan *et al.*, 1995; Sonneborn *et al.*, 1999). Darüber hinaus gibt es weitere zahlreiche Medien zur Chlamydosporeninduktion in *C. albicans*, wie beispielsweise den Taurocholat-Agar oder den Kartoffel-Karotten-Agar (Raubitschek, 1958; Pavlatou und Marselou, 1961). Zudem konnte eine spezifische Chlamydosporenbildung beobachtet werden, wenn Medien mit Zusätzen wie N-Acetyl-D-Glukosamin, Milch oder TOC (Tween-80, Oxgall, Kaffeesäure) supplementiert waren (Fisher und Kane, 1968; Strippoli und Simonetti, 1975; Feo und de Pacheco, 1976; Fleming *et al.*, 1977).

1.4.3 Chlamydosporenbildung in *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Während *C. albicans* lange, kaum verzweigte Filamente mit einzelnen, terminalen Chlamydosporen an der Spitze entwickelt, produziert *C. dubliniensis* am Ende kurzer, stark verzweigter Pseudohyphen, charakteristisch als Dupletts oder Tripletts angeordnete Chlamydosporen (Abbildung 2). Eine solche Anordnung ist typisch für *C. dubliniensis* und lässt, wenn in dieser Form vorhanden, eine Unterscheidung gegenüber *C. albicans* zu (Sullivan *et al.*, 1995; Sullivan und Coleman, 1998; Staib und Morschhäuser, 1999).

1999 beschrieben Staib und Morschhäuser zum ersten Mal eine Methode zur Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*, basierend auf einer Spezies-spezifischen Chlamydosporenbildung. Auf Staib-Agar, einem Medium, das Samen der Pflanze *Guizotia abyssinica* enthält und primär zur Kryptokokkendiagnostik konzipiert wurde, wächst *C. dubliniensis* filamentös und formt raue Kolonien mit zahlreichen Chlamydosporen. *C. albicans* hingegen produziert glatte Hefezellen (Staib, 1962; Staib und Morschhäuser, 1999; Staib und Arasteh, 2001). Auf diesem Festmedium entwickelt *C. dubliniensis* sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 30°C rasch Chlamydosporen, wobei eine Verwendung von Deckgläschen zur Schaffung mikroaerophiler Bedingungen nicht nötig ist.

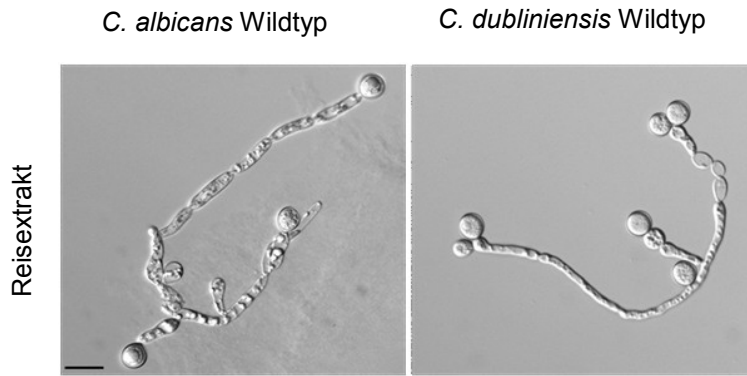


Abb. 2: Mikroskopische Analyse des *C. albicans* Wildtyps SC5314 und des *C. dubliniensis* Wildtyps Wü284. Die Zellen wurden 3 Tage bei 25°C auf Reisextrakt-Agar inkubiert. Maßstabsbalken: 10 µm

1.4.4 Zelluläre Organisation der Chlamydospore

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Zellwand von Chlamydosporen doppelagig ist und aus einer dünnen, elektronentransparenten Außenschicht besteht, welche eine dicke bzw. dichte elektronenundurchlässige Innenschicht umgibt (Miller *et al.*, 1974; Shannon, 1981). Die Dicke der Innenschicht wächst mit steigendem Alter der Chlamydospore und die Außenschicht ist vermutlich durchgehend mit der Suspensorzelle verbunden (Jansons und Nickerson, 1970b). In den 70iger Jahren beschäftigten sich Janson und Nickerson auch mit der chemischen Zusammensetzung von Chlamydosporen. Dabei fanden sie heraus, dass die Außenschicht größtenteils aus β -(1,3)-Glukan und einer geringen Menge an Chitin besteht, wohingegen die dünne Innenschicht große Mengen an Proteinen beinhaltete (Janson und Nickerson, 1970a). Ebenfalls mittels Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass ein beachtlicher Teil des gesamten Zellvolumens von einer großen Vakuole sowie zytoplasmatischen Organellen, ähnlich solcher in Blastosporen, eingenommen wurde (Shannon, 1981). In 1-3 Tage alten Kulturen konnten zudem zahlreiche Mitochondrien und Ribosomen in den Chlamydosporen detektiert werden, deren Anzahl mit steigendem Alter der Chlamydosporen sank (Miller *et al.*, 1974).

Der Fettgehalt in Chlamydosporen betrug etwa 12% des Trockengewichtes und ist im Vergleich zu 5% in Hefezellen relativ hoch (Janson und Nickerson, 1970a). Die für Hefezellen von *C. albicans* charakteristischen Bestandteile wie Glykogen oder Mannan konnten weder in Suspensorzellen noch in Chlamydosporen gefunden werden. Höchstwahrscheinlich werden diese Polymere metabolisiert und in Material umgewandelt, welches die Chlamydospore während ihrer Entwicklung benötigt. Der Prozess der Chlamydosporenbildung wird begleitet von einer umfassenden Kompartimentierung, zum

einen von Proteinen in eine dicke innere Zellwandschicht, zum anderen von Lipiden und RNA in den zentralen Kern (Janson und Nickerson, 1970a; Staib und Morschhäuser 2007). 1996 konnten Vidotto *et al.* zeigen, dass in der Chlamydospore und der Suspensorzelle von *C. albicans*, im Vergleich zum umgebenden Myzel, eine große Menge RNA produziert und/oder akkumuliert wird. Zudem erscheint die Verteilung der RNA relativ unterschiedlich, wohingegen die DNA nahe der inneren Membran lokalisiert ist (Vidotto *et al.*, 1996; Staib und Morschhäuser, 2007). Vidotto *et al.* kamen schließlich anhand ihrer Beobachtungen zu dem Rückschluss, dass Chlamydosporen zelluläre Einheiten mit aktivem Metabolismus, besonders in jungen Chlamydosporen, darstellen und deren Funktion unabhängig vom Myzelium betrachtet werden kann.

Chlamydosporen entwickeln sich an den Spitzen von Hyphen oder Suspensorzellen ähnlich wie bei einer Knospung und wachsen bis sie in etwa eine Größe von 10-12 µm erreicht haben (Martin *et al.*, 2005). Anschließend wird zwischen Suspensorzelle und Chlamydospore ein Septum gebildet, welches die Zellen jedoch nicht voneinander trennt. Martin *et al.* konnten außerdem beobachten, dass der Prozess der Knospung zur Chlamydospore sowie die Kernteilung ein anderer ist als bei Hefezellen. Die Teilung des Kerns erfolgt innerhalb der Suspensorzelle mit anschließender Abwanderung eines Tochterkerns in die Chlamydospore (Martin *et al.*, 2005). Hinsichtlich der Keimung/Germination von Chlamydosporen in *C. albicans* gab es lange Zeit unterschiedliche Aussagen. Raudonis und Smith konnten schließlich Anfang der 80iger Jahre zeigen, dass die Keimung der Chlamydosporen durch ihr Alter beeinflusst wird. Während junge Chlamydosporen (2 d) in der Lage waren zu keimen, konnte dieses Phänomen nicht bei älteren Chlamydosporen (8-14 d) beobachtet werden (Janson und Nickerson, 1970b; Raudonis und Smith, 1982).

1.4.5 Genetische Regulation der Chlamydosporenentwicklung

In den letzten Jahren konnten einige Gene identifiziert werden, die für die Bildung von Chlamydosporen benötigt werden. Dazu gehört der Transkriptionsfaktor Efg1, der bereits im Zusammenhang mit der Regulation des cAMP-abhängigen Signalweges in *C. albicans* beschrieben wurde. Unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen bildete die *C. albicans efg1Δ*-Mutante mehr verlängerte Filamente aus als der Wildtyp, jedoch keine Chlamydosporen (Giusani *et al.*, 2002; Staib und Morschhäuser, 2007). Zuvor war die *efg1Δ*-Mutante vor allem hinsichtlich ihres Defektes in der Hyphenbildung (unter

hypheninduzierenden Bedingungen) aufgefallen (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Maidan *et al.*, 2005). Ebenfalls zu nennen ist die MAP-Kinase Hog1. *Hog1Δ*-Mutanten zeigten unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen einen hyperfilamentösen Phänotyp. Die Chlamydosporenbildung war auch hier unterdrückt, jedoch wurden einzelne zelluläre Strukturen an Hyphenspitzen identifiziert, die an Chlamydosporen erinnerten bzw. ihnen ähnlich waren (Eismann *et al.*, 2006).

Als bedeutender Repressor der Chlamydosporenbildung ist der Transkriptionsfaktor Nrg1 beschrieben. Mit der Integration einer genomischen Bibliothek von *C. albicans* in das Genom von *C. dubliniensis* und folgendem Screening der Transformanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Filamentierung und zur Chlamydosporenentwicklung, identifizierten Staib und Morschhäuser den transkriptionellen Repressor Nrg1 als einen zentralen Repressor der Chlamydosporenbildung. Eine Expression von *CaNRG1* in *C. dubliniensis* unterdrückte die Ausbildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass während des Wachstums in Staib-Medium die Expression des *NRG1*-Gens in *C. dubliniensis*, jedoch nicht in *C. albicans*, herunter reguliert wurde. Zudem resultierte eine Deletion von *NRG1* in *C. albicans* auf Staib-Agar in einer Ausbildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen und in YPD-Medium in einem konstitutiven Wachstum von Pseudohyphen (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001b), Staib und Morschhäuser, 2005). Diese Ergebnisse zeigten, dass die differentielle Regulation von *NRG1* in *C. albicans* und *C. dubliniensis* verantwortlich für die Spezies-spezifische Ausbildung der Chlamydosporen bzw. die Unterschiedliche Reaktion beider Spezies auf die induzierenden Bedingungen ist.

1.5 Zielsetzung

C. albicans und *C. dubliniensis* sind bis dato die einzigen Vertreter der Gattung *Candida*, die in der Lage sind Chlamydosporen und Keimschläuche zu bilden. Im Vergleich zur Hyphenbildung ist über die Entwicklung von Chlamydosporen sowie deren genetische Kontrolle und Regulation bislang wenig bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, neue Einblicke und Erkenntnisse in die morphologische Vielseitigkeit von *Candida*, speziell der Chlamydosporenausbildung, zu bekommen. Dazu wurde in dieser Arbeit erstmals ein globales, vergleichendes Transkriptionsprofil von *C. albicans* und *C. dubliniensis* unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen mit Hilfe von RNA-Sequenzierung und DNA-Microarrayanalysen erstellt. Ausgewählte Kandidaten der dabei

identifizierten Gene in *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurden anschließend funktional charakterisiert. Ziel war es, Proteine zu identifizieren, die spezifisch für Chlamydosporen sind und somit als Marker bzw. neues molekularbiologisches Werkzeug in der Chlamydosporen-Diagnostik genutzt werden könnten. Neben der ungeklärten biologischen Funktion von Chlamydosporen, ist es bis heute nicht gelungen solche Proteine zu identifizieren und spezifisch der Wuchsform der Chlamydospore zuzuordnen.

Darüber hinaus wurden Deletionsmutanten im *C. dubliniensis* Wü284-Wildtyphintergrund und Überexpressionsstämme im *C. albicans* SC5314-Wildtyphintergrund konstruiert und deren Wachstum unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zudem war es von Interesse weitere Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen beiden *Candida*-Spezies zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

2.1.1 Escherichia coli K12-Stamm

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurde der *E.coli*-Laborstamm DH5 α (F-, *endA1*, *hsdR17* [rk-, mk-], *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ [*argF-lac*]U169, λ -, ϕ 80d*lacZ* Δ M15) (Bethesda Research Laboratories, 1986) verwendet.

2.1.2 Plasmide

Für die Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Tabelle 1) fand das Ausgangsplasmid pBluescript KS+ (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) Verwendung.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
<u>Plasmide zur Deletion bzw. Reintegration einzelner Gene und deren Vorstufen:</u>		
pIME2M1	Vorstufe zu pIME2M2	diese Arbeit
pIME2M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>IME2</i>	diese Arbeit
pSSU1G2	[P _{SSU1} -GFP- <i>caSAT1</i>]-Fragment	Labor Staib
pSSU1M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>SSU1</i>	Labor Staib
pcd06420M1	Vorstufe zu pcd06420M2	diese Arbeit
pcd06420M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_06420</i>	diese Arbeit
pcd15800M1	Vorstufe zu pcd15800M2	diese Arbeit
pcd15800M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_15800</i>	diese Arbeit
pcd19040M1	Vorstufe zu pcd19040M2	diese Arbeit
pcd19040M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_19040</i>	diese Arbeit
pcd23160M1	Vorstufe zu pcd23160M2	diese Arbeit
pcd23160M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_23160</i>	diese Arbeit
pcd30750M1	Vorstufe zu pcd30750M2	diese Arbeit
pcd30750M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_30750</i>	diese Arbeit
pcd31810M1	Vorstufe zu pcd31810M2	diese Arbeit
pcd31810M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_31810</i>	diese Arbeit
pcd40770M1	Vorstufe zu pcd40770M2	diese Arbeit

Bezeichnung	Relevante Eigenschaften	Referenz
pcd40770M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_40770</i>	diese Arbeit
pcd54540M1	Vorstufe zu pcd54540M2	diese Arbeit
pcd54540M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_54540</i>	diese Arbeit
pcd80940M1	Vorstufe zu pcd80940M2	diese Arbeit
pcd80940M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_80940</i>	diese Arbeit
pcd87380M1	Vorstufe zu pcd87380M2	diese Arbeit
pcd87380M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_87380</i>	diese Arbeit
pcdCSR1M1	Vorstufe zu pcdCSR1M2	diese Arbeit
pcdCSR1M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_44490</i>	diese Arbeit
pcdIME2M1	Vorstufe zu pcdIME2M2	diese Arbeit
pcdIME2M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_28430</i>	diese Arbeit
pcdPOX18M1	Vorstufe zu pcdPOX18M2	diese Arbeit
pcdPOX18M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_01320</i>	diese Arbeit
pcdSUC1M1	Vorstufe zu pcdSUC1M2	diese Arbeit
pcdSUC1M2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Deletion von <i>CD36_34590</i>	diese Arbeit
pcdCSR1KS1	Vorstufe zu pcdCSR1KS2	diese Arbeit
pcdCSR1KS2	enthält SAT1-Flipperkassette zur Reintegration von <i>CD36_44490</i>	diese Arbeit
<u>Plasmide zur gezielten Expression einzelner Gene und deren Vorstufen:</u>		
pADH1E1	enthält Konstrukt zur Überexpression einzelner Gene im <i>ADH1</i> -Lokus	Reuß <i>et al.</i>
pcdADH1E2	enthält Konstrukt zur Überexpression einzelner Gene im <i>CdADH1</i> -Lokus	Labor Staib
pRFX1E1	enthält <i>RFX1</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1}	diese Arbeit
pWOR2E1	enthält <i>WOR2</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1}	diese Arbeit
pTF1E1	enthält <i>orf19.4046</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1}	diese Arbeit
pTF2E1	enthält <i>orf19.6845</i> unter der Kontrolle von P_{ADH1}	diese Arbeit
pcdCSR1E1	enthält <i>CdCSR1</i> (<i>CD36_44490</i>) unter der Kontrolle von P_{cdADH1}	diese Arbeit
<u>Plasmide mit GFP-Reporterkonstrukten zur Genexpressionsanalyse:</u>		
p3512G1	Vorstufe zu p3512G2	diese Arbeit
p3512G2	Enthält <i>GFP</i> gekoppelt an das letzte Codon vor dem Stop-Codon von <i>orf19.3512</i>	diese Arbeit
p4170G1	Vorstufe zu p4170G2	diese Arbeit
p4170G2	Enthält <i>GFP</i> gekoppelt an das letzte Codon vor dem Stop-Codon von <i>orf19.4170</i>	diese Arbeit
pcd30750G1	Vorstufe zu pcd30750G2	diese Arbeit
pcd30750G2	Enthält <i>GFP</i> gekoppelt an das letzte Codon vor dem Stop-Codon von <i>CD36_30750</i>	diese Arbeit
pcd40770G1	Vorstufe zu pcd4077G2	diese Arbeit
pcd40770G2	Enthält <i>GFP</i> gekoppelt an das letzte Codon vor dem Stop-Codon von <i>CD36_40770</i>	diese Arbeit

2.2 Verwendete *Candida albicans*- und *Candida dubliniensis*-Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Candida albicans*- und *Candida dubliniensis*-Stämme, deren Ausgangsstämme sowie die entsprechenden Genotypen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Erklärung der relevanten Abkürzungen (Genbezeichnungen in kursiver Schrift):

T_{ACT1} = Terminator des Aktin-Gens in *C. albicans*; P_{ADHI} = Promotor der Alkoholdehydrogenase in *C. albicans*; P_{cdADHI} = Promotor der Alkoholdehydrogenase in *C. dubliniensis*; $caFLP$, *C. albicans*-adaptiertes FLP-Rekombinase-Gen aus *S. cerevisiae*; $caSAT1$, *C. albicans*-adaptiertes *SAT1*-Gen aus *E. coli*, dient als dominanter Selektionsmarker in *C. albicans*-Stämmen; *FRT* (FLP-recognition target), minimale Erkennungssequenz der FLP-Rekombinase; *GFP*, Gen des „Grünfluoreszierenden Proteins“ aus *Aequorea victoria* (Morschhäuser *et al.*, 1998); P_{MAL2} , induzierbarer Promotor des *MAL2*-Gens; *URA3*, Gen für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, dient als Selektionsmarker in *ura3*-negativen *C. albicans*-Stämmen.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *C. albicans*- und *C. dubliniensis*-Stämme.

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
SC5314		Wildtypischer Stamm	Gillum <i>et al.</i> (1984)
Wü284		Wildtypischer Stamm	Morschhäuser <i>et al.</i> (1999)
MMC3	CAI4	<i>Canrg1Δ::hisG-CaURA3</i> <i>hisG/Canrg1Δ::hisG</i>	Murad <i>et al.</i> (2001)
<u>Einzelmutanten und entsprechende Komplementanten:</u>			
CaIME2M1A	SC5314	<i>ime2Δ::SAT1-FLIP/IME2</i>	diese Arbeit
CaIME2M1B	SC5314	<i>ime2Δ::SAT1-FLIP/IME2</i>	diese Arbeit
CaIME2M2A	CaIME2M1A	<i>ime2Δ::FRT/IME2</i>	diese Arbeit
CaIME2M2B	CaIME2M1B	<i>ime2Δ::FRT/IME2</i>	diese Arbeit
CaIME2M3A	CaIME2M2A	<i>ime2Δ::FRT/ime2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CaIME2M3B	CaIME2M2B	<i>ime2Δ::FRT/ime2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CaIME2M4A	CaIME2M3A	<i>ime2Δ::FRT/ime2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CaIME2M4B	CaIME2M3B	<i>ime2Δ::FRT/ime2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd06420M1A	Wü284	<i>CD36_06420Δ::SAT1 FLIP/CD36_06420</i>	diese Arbeit
Cd06420M1B	Wü284	<i>CD36_06420Δ::SAT1-FLIP/CD36_06420</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
Cd06420M2A	Cd06420M1A	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420</i>	diese Arbeit
Cd06420M2B	Cd06420M1B	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420</i>	diese Arbeit
Cd06420M3A	Cd06420M2A	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd06420M3B	Cd06420M2B	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd06420M4A	Cd06420M3A	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd06420M4B	Cd06420M3B	<i>CD36_06420Δ::FRT/CD36_06420Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd15800M1A	Wü284	<i>CD36_15800Δ::SAT1-FLIP/CD36_15800</i>	diese Arbeit
Cd15800M1B	Wü284	<i>CD36_15800Δ::SAT1-FLIP/CD36_15800</i>	diese Arbeit
Cd15800M2A	Cd15800M1A	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800</i>	diese Arbeit
Cd15800M2B	Cd15800M1B	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800</i>	diese Arbeit
Cd15800M3A	Cd15800M2A	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd15800M3B	Cd15800M2B	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd15800M4A	Cd15800M3B	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd15800M4B	Cd15800M3B	<i>CD36_15800Δ::FRT/CD36_15800Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd19040M1A	Wü284	<i>CD36_19040Δ::SAT1-FLIP/CD36_19040</i>	diese Arbeit
Cd19040M1B	Wü284	<i>CD36_19040Δ::SAT1-FLIP/CD36_19040</i>	diese Arbeit
Cd19040M2A	Cd19040M1A	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040</i>	diese Arbeit
Cd19040M2B	Cd19040M1B	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040</i>	diese Arbeit
Cd19040M3A	Cd19040M2A	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd19040M3B	Cd19040M2B	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd19040M4A	Cd19040M3A	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd19040M4 B	Cd19040M3 B	<i>CD36_19040Δ::FRT/CD36_19040Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd23160M1A	Wü284	<i>CD36_23160Δ::SAT1-FLIP/CD36_23160</i>	diese Arbeit
Cd23160M1B	Wü284	<i>CD36_23160Δ::SAT1-FLIP/CD36_23160</i>	diese Arbeit
Cd23160M2A	Cd23160M1A	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160</i>	diese Arbeit
Cd23160M2B	Cd23160M1B	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
Cd23160M3A	Cd23160M2A	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd23160M3B	Cd23160M2B	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd23160M4A	Cd23160M3A	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd23160M4B	Cd23160M3B	<i>CD36_23160Δ::FRT/CD36_23160Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd30750M1A	Wü284	<i>CD36_30750Δ::SAT1-FLIP/CD36_30750</i>	diese Arbeit
Cd30750M1B	Wü284	<i>CD36_30750Δ::SAT1-FLIP/CD36_30750</i>	diese Arbeit
Cd30750M2A	Cd30750M1A	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750</i>	diese Arbeit
Cd30750M2B	Cd30750M1B	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750</i>	diese Arbeit
Cd30750M3A	Cd30750M2A	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd30750M3B	Cd30750M2B	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd30750M4A	Cd30750M3A	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd30750M4B	Cd30750M3B	<i>CD36_30750Δ::FRT/CD36_30750Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd31810M1A	Wü284	<i>CD36_31810Δ::SAT1-FLIP/CD36_31810</i>	diese Arbeit
Cd31810M1B	Wü284	<i>CD36_31810Δ::SAT1-FLIP/CD36_31810</i>	diese Arbeit
Cd31810M2A	Cd31810M1A	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810</i>	diese Arbeit
Cd31810M2 B	Cd31810M1B	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810</i>	diese Arbeit
Cd31810M3A	Cd31810M2A	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd31810M3B	Cd31810M2B	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd31810M4A	Cd31810M3A	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd31810M4B	Cd31810M3B	<i>CD36_31810Δ::FRT/CD36_31810Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd40770M1A	Wü284	<i>CD36_40770Δ::SAT1-FLIP/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd40770M1B	Wü284	<i>CD36_40770Δ::SAT1-FLIP/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd40770M2A	Cd40770M1A	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd40770M2B	Cd40770M1B	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd40770M3A	Cd40770M2A	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd40770M3B	Cd40770M2B	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
Cd40770M4A	Cd40770M3A	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd40770M4B	Cd40770M3	<i>CD36_40770Δ::FRT/CD36_40770Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd54540M1A	Wü284	<i>CD36_54540Δ::SAT1-FLIP/CD36_54540</i>	diese Arbeit
Cd54540M1B	Wü284	<i>CD36_54540Δ::SAT1-FLIP/CD36_54540</i>	diese Arbeit
Cd54540M2A	Cd54540M1A	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540</i>	diese Arbeit
Cd54540M2B	Cd54540M1B	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540</i>	diese Arbeit
Cd54540M3A	Cd54540M2A	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd54540M3B	Cd54540M2B	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd54540M4A	Cd54540M3A	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd54540M4B	Cd54540M3B	<i>CD36_54540Δ::FRT/CD36_54540Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd80940M1A	Wü284	<i>CD36_40770Δ::SAT1-FLIP/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd80940M1B	Wü284	<i>CD36_40770Δ::SAT1-FLIP/CD36_40770</i>	diese Arbeit
Cd80940M2A	Cd80940M1A	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940</i>	diese Arbeit
Cd80940M2B	Cd80940M1B	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940</i>	diese Arbeit
Cd80940M3A	Cd80940M2A	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd80940M3B	Cd80940M2B	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd80940M4A	Cd80940M3A	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd80940M4B	Cd80940M3B	<i>CD36_80940Δ::FRT/CD36_80940Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd87380M1A	Wü284	<i>CD36_87380Δ::SAT1-FLIP/CD36_87380</i>	diese Arbeit
Cd87380M1B	Wü284	<i>CD36_87380Δ::SAT1-FLIP/CD36_87380</i>	diese Arbeit
Cd87380M2A	Cd87380M1A	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380</i>	diese Arbeit
Cd87380M2B	Cd87380M1B	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380</i>	diese Arbeit
Cd87380M3A	Cd87380M2A	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd87380M3B	Cd87380M2B	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
Cd87380M4A	Cd87380M3A	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380Δ::FRT</i>	diese Arbeit
Cd87380M4B	Cd87380M3B	<i>CD36_87380Δ::FRT/CD36_87380Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdCSR1M1A	Wü284	<i>Cdcsr1Δ::SAT1-FLIP/CdCSR1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
CdCSR1M1B	Wü284	<i>Cdcsr1Δ::SAT1-FLIP/CdCSR1</i>	diese Arbeit
CdCSR1M2A	CdCSR1M1A	<i>Cdcsr1Δ::FRT/CdCSR1</i>	diese Arbeit
CdCSR1M2B	CdCSR1M1B	<i>Cdcsr1Δ::FRT/CdCSR1</i>	diese Arbeit
CdCSR1M3A	CdCSR1M2A	<i>Cdcsr1Δ::FRT/Cccsr1Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdCSR1M3B	CdCSR1M2B	<i>Cdcsr1Δ::FRT/Cccsr1Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdCSR1M4A	CdCSR1M3A	<i>Cdcsr1Δ::FRT/Cdcsr1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdCSR1M4B	CdCSR1M3B	<i>Cdcsr1Δ::FRT/Cdcsr1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdCSR1K1A	CdCSR1M4A	<i>Cdcsr1-1Δ::FRT/Cdcsr1-2-T_{ACT1}::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdCSR1K1B	CdCSR1M4B	<i>Cdcsr1-1Δ::FRT/Cdcsr1-2-T_{ACT1}::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdCSR1K2A	CdCSR1K1A	<i>Cdcsr1-1Δ::FRT/Cdcsr1-2-T_{ACT1}::FRT</i>	diese Arbeit
CdCSR1K2B	CdCSR1K1B	<i>Cdcsr1-1Δ::FRT/Cdcsr1-2-T_{ACT1}::FRT</i>	diese Arbeit
CdIME2M1A	Wü284	<i>Cdime2Δ::SAT1-FLIP/CdIME2</i>	diese Arbeit
CdIME2M1B	Wü284	<i>Cdime2Δ::SAT1-FLIP/CdIME2</i>	diese Arbeit
CdIME2M2A	CdIME2M1A	<i>Cdime2Δ::FRT/CdIME2</i>	diese Arbeit
CdIME2M2B	CdIME2M1B	<i>Cdime2Δ::FRT/CdIME2</i>	diese Arbeit
CdIME2M3A	CdIME2M2A	<i>Cdime2Δ::FRT/Cdime2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdIME2M3B	CdIME2M2B	<i>Cdime2Δ::FRT/Cdime2Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdIME2M4A	CdIME2M3A	<i>Cdime2Δ::FRT/Cdime2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdIME2M4B	CdIME2M3B	<i>Cdime2Δ::FRT/Cdime2Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdPOX18M1A	Wü284	<i>Cdpox18Δ::SAT1-FLIP/CdPOX18</i>	diese Arbeit
CdPOX18M1B	Wü284	<i>Cdpox18Δ::SAT1-FLIP/CdPOX18</i>	diese Arbeit
CdPOX18M2A	CdPOX18 M1A	<i>Cdpox18Δ::FRT/CdPOX18</i>	diese Arbeit
CdPOX18M2B	CdPOX18M1B	<i>Cdpox18Δ::FRT/CdPOX18</i>	diese Arbeit
CdPOX18M3A	CdPOX18M2A	<i>Cdpox18Δ::FRT/Cdpox18Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdPOX18M3B	CdPOX18M2B	<i>Cdpox18Δ::FRT/Cdpox18Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdPOX18M4A	CdPOX18M3A	<i>Cdpox18Δ::FRT/Cdpox18Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdPOX18M4B	CdPOX18M3B	<i>Cdpox18Δ::FRT/Cdpox18Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdSUC1M1A	Wü284	<i>Cdsuc1Δ::SAT1-FLIP/CdSUC1</i>	diese Arbeit
CdSUC1M1B	Wü284	<i>Cdsuc1Δ::SAT1-FLIP/CdSUC1</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
CdSUC1M2A	CdSUC1M1A	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1</i>	diese Arbeit
CdSUC1M2B	CdSUC1M1B	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1</i>	diese Arbeit
CdSUC1M3A	CdSUC1M2A	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdSUC1M3B	CdSUC1M2B	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1Δ::SAT1-FLIP</i>	diese Arbeit
CdSUC1M4A	CdSUC1M3A	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1Δ::FRT</i>	diese Arbeit
CdSUC1M4B	CdSUC1M3B	<i>Cdsuc1Δ::FRT/Cdsuc1Δ::FRT</i>	diese Arbeit

Mutanten, die Gene unter der Kontrolle von PADH1 exprimieren:

CaRFX1E1A	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-RFX1-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaRFX1E1B	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-RFX1-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaWOR2E1A	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-WOR2-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaWOR2E1B	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-WOR2-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaTF1E1A	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-orf19.4046-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaTF1E1B	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-orf19.4046-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaTF2E1A	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-orf19.6845-caSAT1</i>	diese Arbeit
CaTF2E1B	SC5314	<i>ADH1/adh1::P_{ADH1}-orf19.6845-caSAT1</i>	diese Arbeit
CdCSR1E1A	Wü284	<i>ADH1/adh1::P_{cdADH1}-CdCSR1-caSAT1</i>	diese Arbeit
CdCSR1E1B	Wü284	<i>ADH1/adh1::P_{cdADH1}-CdCSR1-caSAT1</i>	diese Arbeit

Reporterstämme, die GFP an die letzte Aminosäure eines zu untersuchenden Genes gekoppelt haben:

Ca3512G1A	SC5314	<i>orf19.3512/orf19.3512-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
Ca3512G1B	SC5314	<i>orf19.3512/orf19.3512-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
Ca4170G1A	SC5314	<i>orf19.4170/orf19.4170-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
Ca4170G1B	SC5314	<i>orf19.4170/orf19.4170-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
SCMTLa3512G1A	SCMTLaM2A	MATa/mataΔ;GFP	diese Arbeit
SCMTLa3512G1B	SCMTLaM2B	MATa/mataΔ;GFP	diese Arbeit
SCMTLa3512G1A	SCMTLaM2A	MATa/mataΔ;GFP	diese Arbeit
SCMTLa3512G1B	SCMTLaM2B	MATa/mataΔ;GFP	diese Arbeit
Cd30750G1A	Wü284	<i>CD36_30750/CD36_30750Δ::CD36_30750-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
Cd30750G1B	Wü284	<i>CD36_30750/CD36_30750Δ::CD36_30750-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit

Stamm	Ausgangsstamm	Genotyp ^a	Referenz
Cd40770G1A	Wü284	<i>CD36_40770/CD36_40770Δ::CD36_40770-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit
Cd40770G1B	Wü284	<i>CD36_40770/CD36_40770Δ::CD36_40770-GFP-T_{ACT1}</i>	diese Arbeit

^a außer den beschriebenen Eigenschaften haben alle Stämme den Genotyp des Ausgangsstammes.

2.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 3) wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen sind mit fettgedruckten, großgeschriebenen Buchstaben hervorgehoben, Nukleotidsubstitutionen für die Einführung von Restriktionsschnittstellen bzw. zur spezifischen Mutagenese sind kleingeschrieben und ebenfalls fettgedruckt. TA bezeichnet die Annealing-Temperatur bei der PCR. Die Sequenzier-Primer sind mit „S“ gekennzeichnet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Primer	TA (°C)	Sequenz (5'→3')
Ca3512-1	55	GTT AGC TGA ATC CAG GGC cCT CAC TGT GTG G
Ca3512-2	55	CCA GTC TTG AAA CAC gga tcc ATC ATG TTT TTG TTT C
Ca3512-3	55	CGT GTT TCA AGA CTG cag TTG AAT AAC GCC AAC
Ca3512-4	55	CAA AAT TAA TCA GCT AAC Tga GCT CGT TGC CTT AA
Ca3512-5	S	GAC AAT TAT GAA CAT AAAC
Ca3512-6	S	GCC ATG ACA AAT GC
Ca3512_fw1	60	ACA CCA CTG CAA GTA TCC ATA TTG TGA
Ca3512_rev1	60	ATC TTG TAT AAC CCT TTG TCG TCA AC
Ca4170-1	55	GGT CCA ATA TAT CGg gCC CGT GTT TCT TGA ATG G
Ca4170-2	55	CCC ACT TAT TTG TGA CAA ACg gat ccA TCA TGT TGT TTC
Ca4170-3	55	GTT AGT TTG TCA CAc tgc AGT GGG AGG GGG TTC
Ca4170-4	55	GGT GAA CAT AAC AAT GGA Gct cCA ACT TAT C
Ca4170-5	S	GTG AAA TCG ATA CTT ATG AAT GG
Ca4170-6	S	CTC AAT CGT TCA TAC TGA AGG AAC

Primer	TA (°C)	Sequenz (5'→3')
Ca4170_fw1	60	GCT ACT GGT GAA ATT GTT GCT AAT C
Ca4170_rev1	60	TCA TCA TCA CAG TCA TCG CTA TC
CaIME2-1	50	GGT TGT CCA ATG Ggc cCA TTA CTC ATT AAA TT
CaIME2-2	50	GGG AAA GAA TGG TGT Ctc GAg ATT GGT GTA GTT G
CaIME2-3	50	CCC AGA AGA GCC GcG gAT GAA GCA CAC GAT TTG
CaIME2-4	50	TTT AAT TGG AAC AAC gag CTC TGC TTT TTC ATC TTG C
CaRFX1-1	50	ATA TAc tcg agA AAA TGA GCT CAG ATC AGA CAC CTC AAA ATC G
CaRFX1-2	50	ATA TAA gat ctT CAA TTT AAT AAA TTA TCA ATA TTT GTT TCA AAA TTC
CaRFX1-3	S	CGA ATT GAA ACA ATT AGC GCT ACG
CaRFX1-4	S	CGA GGG CAC ACA CAC CGT CAT TTT CTC C
CaRFX1-5	S	GTT GAG TAA GCT ACA GTT GCA ACT CTT GAT ACC
CaTF1-1	50	ATA TAc tcg agA AAA TGA CTG AAG ACA CAG TGC AAG TAT ATG TG
CaTF1-2	50	ATA TAA gat ctC TAT ACA AAA TTT TGT CCT AGC ATT TGT TGT A
CaTF2-1	50	ATA TAc tcg agA AAA TGG GAT TTA TTA ATC CAG GAA AAT CTT TG
CaTF2-2	50	ATA TAA gat ctT TAA CCA AAT CTA TGT AGT ATA TCG TAA TCA GG
CaWOR2-1	50	ATA TAc tcg agA AAA TGA CAC AAT TAC CTT CTG TTT CAG AAT TG
CaWOR2-2	50	ATA TAA gat ctT TAT TTA AGT AAA TCA GCC ACT GAA AC
CD36_06420-1	55	CAA ATT GTA GAT GA gGG CCc AAT TGA TTT TAG
CD36_06420-2	55	AAA GAG TGA CTC gag CCA TAA TTA ATG TGC
CD36_06420-3	55	CGA TTA GAG AGT CCC gcg gAG CAT TGC TAA TC
CD36_06420-4	55	CCC TAG ACC TAA ATA GAG ctc ATT TAT ACA TG
CD36_15800-1	50	GCG TGA ACC TAA AAG TGC Ggg cCC AAA GTT ATA AAT GTT
CD36_15800-2	50	GAA TCA TAT TAG ATT AGC CTc GAG AAA GAA AAG AAG G
CD36_15800-3	50	CCA ACA GAA GAA ACA CCg cgg ACT ATA AAT TG
CD36_15800-4	50	TAG CCC TGT AAT TTA GAg cTC TAA CTG AAG CAC
CD36_15800_fw1	60	CAG CTT GTA TTT TTT CCC ATG

Primer	TA (°C)	Sequenz (5'→3')
CD36_15800_rv1	60	GAA AGA TTT AAT AGA CAA CTG TG
CD36_19040-1	55	CAA GAA ATA gGG CCc AGA CTA TAG ATG
CD36_19040-2	55	CAT GGT TAT TTA ATG TcT cGA GGT AGT TGA G
CD36_19040-3	55	GAA GCA TAC AcC gcG GTA AAC TCT TGT TTT TG
CD36_19040-4	55	GTT GTC TAA AGA GcT cAG GGT TTG ACT TGC C
CD36_23160-1	55	CAA TTT TCC GGG Ccc TGT TCA TCT TTA CTT G
CD36_23160-2	55	GCA ACG ACA CCA TCC Tcg aGT TTT ATT GGG AAT TG
CD36_23160-3	55	GCT TCA ATT ACA AGC TTA TCc gcG GTT TGC TTT TCG C
CD36_23160-4	55	CTA CAT ATG AAT GAG ctc ACT AAG AAG GAA
CD36_30750-1	55	GGT GGG GTT CgG GCC cCC ATA TTC TAT TTT TAA G
CD36_30750-2	55	GTT AAA GCA GCT cgA GAA AAC TTC ATT TAA TG
CD36_30750-3	55	GAT TAA ATC ATG TCT CAA ccg cGG TTT CGA ATA AC
CD36_30750-4	55	ATC AGC TAA Cga GCT CGT TGG CTT AAA TCC
CD36_30750-5	55	CCA ATC TTG AGA CAT Gga TCC ATC ATA CTT CTC TTT C
CD36_30750-6	55	GAT TAA ATC ATG TCT gcA GAT GGT TTC GAA TAA C
CD36_30750-7	55	GCA GTA GAA AAC TTC ATT gtc gac TAA GTT GAG TTG TTG
CD36_30750-8	S	GTT ACT TAC AGT ACA GAG TTT GG
CD36_30750-9	S	GCA AGG ATG ATG AAA AGT GCC ATC
CD36_30750_fw1	60	CAA ATG CAA GGA TGA TGA AAA G
CD36_30750_rv1	60	CTT CAG TGT GAA CAA TAG AGA A
CD36_31810-1	55	GTA TTC CCT TTT AGG TAc cCT AAA TGC GCA CTC C
CD36_31810-2	55	GTA TGA CAC AAC Act cgA GAT CTC TAA TTA TTA GAA G
CD36_31810-3	55	TGC CAA AAC CCA ATT A ccg CGG GAT AAT CCA
CD36_31810-4	55	GAA GAA AAC AAC CTG AAT A gag cTC TAC AAT CTA TAC ATG
CD36_40770-1	55	GTT TAG ATA TAC Agg GCC CAG TAT AAA CTT CAT C
CD36_40770-2	55	GTT AAA GCA GCT cgA GAA AAT TTC ATA TTG T G
CD36_40770-3	55	CAG ATG AAA GAG CCg Cgg TTT CAG ATG ACA ATG
CD36_40770-4	55	TAA AGC ATG GCC gaG CTC ACT TTG ATG AC
CD36_40770-5	55	CTG GTT CTC ATA TGA CAA AGg gat cca TCA TGT TGT TTC

Primer	TA (°C)	Sequenz (5'→3')
CD36_40770-6	55	CAA CAT GAT TAA TTG CTg cag CAT ATG AGA ACA CG
CD36_40770-7	S	GGC GAT GAT GAC GAC AAT TCA AAA C
CD36_40770-8	S	GCC TTA CAC AAG GAA GGA TTT TC
CD36_40770_fw1	60	ACT GTA AAT ATC CAT ACT GTG A
CD36_40770_rv1	60	TAT AAT CCT TTG TCA TCA ACT TTA
CD36_54540-1	55	GTA TAT GAG TTG CTA ATG Ggc cCC TCC AAT GCG G
CD36_54540-2	55	CCA CCA AGT ATA CTC gag TGT CAT AAC TAA TAG G
CD36_54540-3	55	GTT TTC AAC ACA CCA ACC gcG GAC TAG AGT TAA TG
CD36_54540-4	55	GTA ATA ACT TTT TAT AgA gCT CAA ACT AAC TAG
CD36_80940-1	55	GTA GTA TAT TAT TAT TGG Gcc cTC GTC AAT TTG C
CD36_80940-2	55	GTT GTA GTC GcT CGa GAT TAA TCG TGG TGG
CD36_80940-3	55	CAG ATA TGA TAA TTC cGC gGG AGC TCC TAC
CD36_80940-4	55	GAA TAT TTT GTA AAA CCG TGA Gct cTT TTT AAA ACG C
CD36_87380-1	55	GTG TTG GCT TGg gCC CAG TAG AGA GAG GAG GG
CD36_87380-2	55	GAA TAT TTT AAA AAT CcT CGa GGA AGA ATA GTA CTG
CD36_87380-3	55	CAG TGA CTA ATC TAA TTG TTc cGC GGG CAA GTA AG
CD36_87380-4	55	GAT GTT TAT TTC TgA gCT CTA GAT GTG CGA CAC C
CD36_ACT1_fw1	60	GAT GGT CAA GTT ATC ACT ATT GGT AAC GA
CD36_ACT1_rv2	60	GAA CAA TAG ATG GAC CAG ATT CGT C
CD36_CSR1-1	58	GTT GGT AGC ACC AAT GGg CCC CCT CTT TG
CD36_CSR1-2	58	GAT TAG TAT TCT cga GAC CAC CCG CAA TTG G
CD36_CSR1-3	58	GAA CAT TCA ACT GAG AAA ccg cgG AAA AAT TGT ATT
CD36_CSR1-4	58	GCC GAA CCA TgA GCT cAA ATA GAC AAG ATC AAT G
CD36_CSR1-5	58	CGA TAA AAA TAT AAT ACA ATT aga tct TTA TTT CTC AGT TG
CD36_CSR1-6	S	GAA GTT CAG GTT GAA TTT TCC AG
CD36_CSR1-7	S	GTT CGT CAT TGC CAC AAC CTA C
CD36_CSR1-8	S	CTA CTA GAC CCA TGC TGT ATT C
CD36_CSR1-9	S	CTT GAT GTC CAT ATA GGA T
CD36_CSR1-10	58	ATA Tag teg acA AAA TGT TAC CAA TTG CGG GTG GTC CAC AGA ATA C

Primer	TA (°C)	Sequenz (5'→3')
CD36_CSR1_fw1	60	AAT GGA GAC CCA CTT TAT TGT A
CD36_CSR1_rv1	60	TCT CAC CTG AAT GAA CTC G
CD36_IME2-1	50	GTT GGT TGT CCA ATG GGC CCC ATT ACT CGT CC
CD36_IME2-2	50	GGG AAA GAT TGG TGT CTC GAG ATT GGT ATA GTT G
CD36_IME2-3	50	CCC AGA AGA GCT GGC CGC GGA ACA AGC GAT TTA AAG
CD36_IME2-4	50	GTT ATA TTC TAT TTC CTG AGC TCT ATT GAT ATT G
CD36_POX18-1	50	GAC ACT GAA GCG GGC ccT AAA ATC CCA GG
CD36_POX18-2	50	GGC TTG AAA TCC TcG AGC AGC AAG G
CD36_POX18-3	50	CCT GTT CCA GCT AAG Ccg cgg ATG ATG TGC TTT
CD36_POX18-4	50	GTA CTT TGG AGG AGC TcG CCA GCA CCA AAT C
CD36_SUC1-1	55	TGA AAT ACT TTT ggg CCC CAT AAA AAA ATG CCG
CD36_SUC1-2	55	GCC GCG TAT AAG GTG CTC gag TAG TCA TAG
CD36_SUC1-3	55	GAG AAA TCA AGA ATA TAC CGc gGA CAG CGT TTG AG
CD36_SUC1-4	55	GAA GCT TGT ATC gag CTC GTC ATA ATT TCC TG

2.4 Geräte und Chemikalien

Die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Geräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Hersteller bzw. Vertreiber von benötigten Chemikalien sind an geeigneter Stelle im Methodenteil angegeben. Alle nicht erwähnten Geräte, Chemikalien und Materialien wurden von den Firmen Amersham, Applichem GmbH, Biometra GmbH, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Difco, Eppendorf AG, GE Healthcare Life Sciences, Gibco Life Technologies, Gilson, Greiner Bio-one, Merck KGaA, Eurofins MWG GmbH, Oxoid, Peqlab Biotechnologie GmbH, Pharmacia, Carl Roth GmbH + Co. KG, Serva Electrophoresis GmbH und Sigma Sigma-Aldrich Chemie GmbH geliefert.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller bzw. Anbieter
Brutschränke	UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH
CO ₂ -Inkubator (Unitherm)	Uniequip
Inkubator (25°C, Typ 6200)	Heraeus
Digitalkamera (PowerShot A640)	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, D
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Farbkamera (AxioCam MRc) für mikroskopische Aufnahmen	Carl Zeiss, Jena, D
Geldokumentationsanlage (G:Box)	Syngene
Hybridisierungsofen (Hybaid Shake 'n' Stack)	Thermo Scientific
Mikroskop (Axiostar plus)	Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskop (Zeiss Axio-Observer. Z1)	Carl Zeiss, Jena, D
Sicherheitswerkbank HB 2448	Holten LaminAir
Spektrophotometer (BioMate 3)	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, D
Thermocycler (Veriti 96-Well Thermal Cycler)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
UV-Crosslinker	Vilber Lourmat
Vakuumblotter (VacuGene XL)	GE Healthcare, München, D
Präzisionswaagen (Atilon)	Acculab
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge Pico)	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804 R)	Eppendorf, Hamburg, D
Kühlzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 R)	Eppendorf, Hamburg, D
NanoDrop	NanoDrop Technologies. Implen GmbH; München, D
Agilent 2100 Bioanalytiker	Agilent Technologies, Böblingen, D
Stratagene Mx 3005P	Agilent Technologies, Böblingen, D

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Anzucht von *E. coli*

Für eine Flüssigkultur wurden *E. coli*-Zellen in LB-Medium (Tabelle 5) über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) kultiviert. Eine mit *E. coli*-Zellen beimpfte LB-Agarplatte (1,5% Agar) wurde über Nacht bei 37°C im Inkubator bebrütet. *E. coli*-Stämme, die Plasmide enthalten, wurden sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigkultur unter Selektionsdruck kultiviert (100 µg/ml Ampicillin).

2.5.2 Anzucht von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Zur Kultivierung beider *Candida*-Spezies wurden unterschiedliche Medien verwendet. Für die Herstellung der entsprechenden Agarplatten wurden je 1,5% Agar zugesetzt. Flüssigkulturen wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei 30°C über Nacht in einem Schüttler (200 rpm) inkubiert, beimpfte Agarplatten 2 Tage bei 30°C in einem Inkubator/Brutraum.

2.5.3 Standardmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurde zur Anzucht von *C. albicans* und *C. dubliniensis* YPD-Medium (Tabelle 5) als Vollmedium verwendet. Übernachtskulturen in YPD- oder SD-Medium (Tabelle 5) wurden zum Überimpfen in andere Medien, zur Transformation oder zur DNA-Isolierung genutzt.

2.5.4 Selektionsmedien

Eine Selektion Nourseothricin-resistenter Transformanten wurde mittels YPD-Agarplatten durchgeführt, denen 200 µg/ml (*C. albicans*-Transformanten) bzw. 100 µg/ml (*C. dubliniensis*-Transformanten) Nourseothricin (Werner Bioagents, Jena) zugesetzt wurden. Die Anzucht Nourseothricin-resistenter Stämme in Flüssigmedium erfolgte in YPD-Medium mit 100 µg/ml Nourseothricin. Zur Deletion der SAT1-Flipperkassette aus positiven Transformanten wurden die einzelnen Klone über Nacht in YPM-Medium (Tabelle 5) kultiviert. Das Screening auf Nourseothricin-sensitive Derivate erfolgte zunächst auf YPD-Platten. Diese wurde für 2 Tage (d) bei 30°C inkubiert. Anschließend

wurden die dort gewachsenen Transformanten parallel auf YPD-Platten und YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin kultiviert (2 d, 30°C). Nourseothricin-resistente Stämme waren in der Lage sowohl auf den YPD-Platten als auch auf den YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin zu wachsen.

2.5.5 Induktion der Chlamydosporenbildung in *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Beide *Candida*-Spezies besitzen die Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen Chlamydosporen zu bilden. Für deren Induktion in *C. albicans* wurde Reisextrakt-Agar (Tabelle 5) verwendet. Die zu testenden Stämme wurden auf den Agarplatten ausgestrichen und teilweise mit einem Deckgläschen (mikroaerophile Umgebung) bedeckt. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 25°C für 2-3 Tage. *C. dubliniensis* ist in der Lage neben Reisextrakt-Agar auch auf Staib-Agar bzw. Medium (Tabelle 5) Chlamydosporen zu entwickeln. Für eine Induktion von *C. dubliniensis*-Chlamydosporen in Flüssigmedium wurden alle zu testenden Stämme zunächst in YPD-Medium über Nacht angezogen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung (1:100) in Staib-Medium und Inkubation unter Schütteln für 28 Stunden (h) bei 25°C. Die Kultivierung der Stämme auf Staib-Agarplatten erfolgte bei 25°C für 2-3 Tage.

2.5.6 Induktion der Hyphenbildung in *C. albicans* und *C. dubliniensis*

C. albicans und *C. dubliniensis* besitzen die Fähigkeit unter verschiedenen Bedingungen zu filamentieren. Zum einen kann die Hyphenbildung mittels fetalem Kälberserum (FCS-fetal calf serum; Tabelle 5) induziert werden. Dafür wurden die zu testenden Stämme über Nacht in flüssigem YPD-Medium angezogen und anschließend in destilliertem Wasser mit 10% FCS bei 37°C für 1-6 h geschüttelt (100 rpm). Eine weitere Möglichkeit zur Hypheninduktion beider *Candida*-Spezies bietet der pH-Shift. Hierfür wurden alle zu untersuchenden Stämme über Nacht in flüssigem M199-Medium (pH4) (Tabelle 5) bei 30°C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in M199-Medium mit pH 8 überimpft und bei 37°C für 1-6 h geschüttelt (150 rpm).

Im Gegensatz zu *C. dubliniensis* ist *C. albicans* zusätzlich in der Lage im Zellkulturmedium DMEM und auf Kochblut-Agarplatten (Tabelle 5) Filamente auszubilden. Für eine Induktion der Hyphen im DMEM-Medium wurden ebenfalls Vorkulturen der zu testenden Stämme im YPD-Medium hergestellt und diese im Anschluss in Zellkulturmedium überimpft und bei 37°C für 1-6 h geschüttelt (150 rpm). Auf den

Kochblut-Agarplatten wurde alle zu untersuchenden *C. albicans*-Stämme ausgestrichen und für 2 Tage bei 37°C, 5 %CO₂ und etwa 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Medien und Agar.

Medien	Hersteller bzw. Zusammensetzung
LB-Medium	1 % Pepton aus Casein 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
YPD-Medium	2 % Pepton aus Casein 1 % Hefe-Extrakt 2 % Glucose
SD-Medium	0,67 % YNB ohne Aminosäuren 2 % Glucose
YPM-Medium	2 % Pepton aus Casein 1 % Hefe-Extrakt 2 % Maltose
Reisextrakt-Agar (BBL Rice Extract Agar)	Becton Dickinson 15 g Reisextrakt Agar 10 ml Tween 80 (Merck) 1 l H ₂ O, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
Medien	Hersteller bzw. Zusammensetzung
Staib-Agar (syn. <i>Guizotia abyssinica</i> -Kreatinin-Agar)	5 % pulverisierte <i>Guizotia abyssinica</i> -Pflanzensamen 0,1 % Glucose 0,1 % KH ₂ PO ₄ 0,1 % Kreatinin
Kochblut-Agar (Chocolate Agar [GC II Agar with IsoVitaleX])	Becton Dickinson
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
DMEM	PAA Laboratories GmbH
M199	Sigma Aldrich

2.6 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle molekularbiologischen Methoden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Hierzu zählen unter anderem die Phenolisierung von Plasmid-DNA, alkoholische Fällung, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und die Ligation von DNA-Fragmenten.

2.6.1 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Dafür wurden zunächst 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (2 min; 13000 rpm) und das Zell-Pellet für 5 min bei Raumtemperatur in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose; 10 mM EDTA [Ethylendiamintetraessigsäure] pH 8,0; 25 mM Tris/HCl pH 7,5) inkubiert. Nach Abkühlen der Suspension auf Eis wurden 200 µl der Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung 3 (3 M Natriumacetat, pH 4,8), eine gründliche Durchmischung und eine kurze Inkubation der Suspension auf Eis. Nach einer anschließenden Zentrifugation (5 min; 13000 rpm) wurde der wässrige Überstand vom Pellet abgezogen, 2 min in 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und der wässrige Überstand nach erneuter Zentrifugation (3 min, 13000 rpm) in 1 ml 100 % Ethanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde dann nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min; 13000 rpm) mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 50 µl bidest. H₂O + 1 µl RNase A (Stocklösung 10 mg/ml) gelöst. Die so gewonnene Plasmid-DNA (100-200 ng/µl DNA) wurde bei -20°C gelagert.

2.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Reinigung der PCR-Produkte

Die Amplifizierung von bestimmten DNA-Sequenzen wurde nach einer Methode von Saiki *et al.* (1988) durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen dieser Arbeit wurde die Phusion DNA-Polymerase (Finnzymes) unter Beachtung der Herstellerangaben verwendet. Diese Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (proofreading) erlaubt. In der Regel wurden alle PCR-Reaktionen in einem Ansatzvolumen von 50 µl in 30 Amplifikations-Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus umfasste einen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, eine Primer-Annealing Phase von 1 min und eine Elongationszeit von 1 min pro kb Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bei 72°C. Auf den letzten Amplifikationszyklus folgte eine finale Elongation von 5 min bei 72°C. Die gewählten Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Als Template wurden 0,1-1 µg chromosomaler *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis*-DNA eingesetzt. Die Ansätze enthielten außerdem 10 µl des mitgelieferten Puffers, je 0,2 mM der Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 100 pM der zu verwendeten Primer und 0,02 U/µl Phusion DNA-Polymerase. Die Überprüfung der PCR-Reaktionen

erfolgte mittels 1% igem Agarosegels, auf dem 5 µl des Ansatzes aufgetrennt wurden. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Ansätze zunächst in 150 µl bidest. H₂O aufgenommen und mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann in 1 ml 100% Ethanol sowie 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) überführt und über Nacht bei – 20°C gefällt. Das PCR-Produkt wurde schließlich mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 41 µL bidest. H₂O gelöst.

2.6.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Spaltungen von Plasmid-DNA wurden 10-20 Units der jeweiligen Restriktionsendonuklease eingesetzt. Als Spaltpuffer wurde entweder 10x FastDigest Buffer (Fermentas) oder 10x NEBuffer verwendet, die allen Ansätzen in einfacher Konzentration zugesetzt wurden. Für eine Überprüfung von *E. coli*-Transformanten wurden 3 µl Plasmid-DNA und je 1 µl der entsprechenden Restriktionsendonuklease in einem 20 µl Ansatz für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Spaltungen mit anschließender Gelaufreinigung der Fragmente wurden 10 µl (für Vektoren) bzw. 25-30 µl (für Inserts) Plasmid-DNA mit je 2 µl der jeweiligen Enzyme in einem 50 µl Ansatz für 4-6 h bei 37°C inkubiert. Die Gewinnung linearer Fragmente für eine Transformation von *C. albicans*-bzw. *C. dubliniensis* (30 µl Plasmid-DNA) und die Spaltung von gereinigten PCR-Produkten (41µl) erfolgte analog zu den präparativen Spaltungen. Um *C. albicans*-bzw. *C. dubliniensis*-Transformanten zu überprüfen, wurden 10 µg chromosomaler DNA mit 2 µl des entsprechenden Enzyms in einem 30 µl Ansatz über Nacht bei 37°C gespalten/verdaut. Als DNA-Größenstandard für die Gelelektrophorese diente eine 1 kb DNA-Leiter bzw. 1 kb plus DNA-Leiter (Invitrogen, Life Technologies).

2.6.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung von Restriktions- bzw. PCR-Ansätzen erfolgte in 1% igem Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (50x TAE [Tris-Acetate-EDTA]-Stocklösung: 242 g Tris; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l dest. H₂O. Dafür wurden alle Spaltansätze mit 1x Auftragepuffer (6x Puffer: 0,05% Bromphenolblau; 25% Glycerol; 150 mM EDTA pH 8,0; 25 mM Tris/HCl pH 7,0) versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Die Elution der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe des „GeneClean III“ Kits (MP Biomedicals, Eschwege, D) durchgeführt. Zunächst wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad angefärbt und unter UV-Licht die entsprechenden DNA-Banden

ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden dann in 400 µl Natriumiodid-Lösung aufgenommen und bei 50 °C vollständig gelöst. Nach Zugabe von 8 µl Glasmilch wurden die Ansätze gründlich gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert (1 min; 13000 rpm). Anschließend wurden die Pellets 2-mal mit je 200 µl eiskalter „New-Wash“-Lösung gewaschen, in 15 µl bidest. H₂O aufgenommen und erneut bei 50°C inkubiert (5 min). Nach abschließender Zentrifugation (1 min; 13000 rpm) konnte der wässrige DNA-haltige Überstand abgenommen und weiterverarbeitet werden. Lineare DNA-Fragmente, die für die Transformationen von *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis*-Zellen Verwendung fanden, wurden nur in 6 µl bidest. H₂O (ca. 1 µg DNA) aufgenommen.

2.6.5 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode hergestellt. Dafür wurden 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium überimpft und 3-4 h bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7-0,9 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Nachdem die Kultur die richtige OD erreicht hatte, wurde sie in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Es folgte die Resuspension des Zellpellets in 20 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung und eine 25 minütige Inkubation auf Eis. Dann wurde die Suspension zentrifugiert (10 min; 3000 rpm) und erneut in 5 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Daraufhin wurde dem Ansatz steriles Glycerin (86%) zugegeben, sodass die finale Konzentration an Glycerin 15% betrug. Die so hergestellten kompetenten *E. coli*-Zellen wurden schließlich zu je 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.6 Ligation und Transformation von Plasmid-DNA

Alle Ligationen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des „Rapid DNA Ligation“ Kits von Fermentas durchgeführt. Dazu wurden in 15 µl-Ansätzen je 1 µl gespaltene und gereinigte Vektor-DNA, 5 µl Insert-DNA, 3 µl 5x Ligationspuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) sowie 5 µl bidest. H₂O eingesetzt. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte bei Raumtemperatur für 1 h. Direkt im Anschluss wurden kompetente *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden 200 µl der kompetenten Zellen zunächst 15 min auf Eis aufgetaut und dann mit 12 µl des Ligationsansatzes vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 90 sec im Wasserbad. Danach wurden die Ansätze sofort auf Eis abgekühlt (ca. 30 sec) und mit 1 ml LB-Medium

versetzt. Nach 90 min Inkubation bei 37°C wurden die Ansätze zentrifugiert (2 min; 4000 rpm), die Zellen in ca. 100 µl des Überstandes resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.6.7 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe von DNA-Sequenzierungen (Sequence Laboratories Göttingen, Deutschland) wurden alle klonierten PCR-Produkte vor deren Verwendung auf Richtigkeit der Nukleotidsequenz überprüft. Hierzu wurde für jeden Sequenzierungsansatz 1 µl (0,5-0,7 µg) Plasmid-DNA als Template, 1 µl Primer (20 pmol) und 5 µl bidest. H₂O eingesetzt. Die Primer M13 uni (für die Sequenzierung der 3'-Sequenzen) und M13 rev (für die Sequenzierung der 5'-Sequenzen) binden dabei in der *multiple cloning site* des pBluescript II KS-Vektors.

2.6.8 Transformation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* durch Elektroporation

Für die Herstellung der Deletionsmutanten und deren Komplementanten, der Überexpressionsstämme sowie der *GFP*-Reporterstämme wurden die Wildtypen *C. albicans* SC5314 oder *C. dubliniensis* Wü284 bzw. ein davon abgeleiteter Stamm transformiert. Die Transformanten, die nach erfolgreicher Elektroporation das DNA-Fragment mit dem Nourseothricin-Resistenzgen (*caSAT1*-Marker) ins Genom integriert hatten, konnten als Nourseothricin-resistente Kolonien von sensitiven Ausgangsstämmen in Gegenwart von Nourseothricin selektiert werden. Für die Transformation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurden stets lineare DNA-Fragmente eingesetzt, die zuvor durch Restriktionsverdau der entsprechenden Plasmid-DNA und anschließender Gelaufreinigung gewonnen wurden. Eine Flankierung dieser Transformationsfragmente mit 5'- und 3'-Sequenzen des Zielgenes ermöglichte so die chromosomale Integration mittels homologer Rekombination in den Ziellocus. Zur Herstellung elektroporationskompetenter *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis*-Zellen wurde zunächst eine Kolonie des zu transformierenden Stammes über Nacht in 10 ml YPD-Medium bei 30°C schüttelnd kultiviert. Am nächsten Tag wurden von der Vorkultur 5 µl in 50 ml frisches YPD-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 1,2-2 weiterinkubiert (über Nacht; 30°C; 200 rpm). Am folgenden Tag wurde die Kultur in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 8 ml sterilem bidest. H₂O resuspendiert und nach Zugabe

von je 1 ml 10x TE-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA pH 7,5) und 1 M Lithiumacetat (pH 7,5; mit Essigsäure eingestellt) für 1 h bei 30°C und 200 rpm geschüttelt. Nach Zugabe von 250 µl 1 M DTT folgte eine erneute Inkubation im Schüttler für 30 min bei 30°C. Im Anschluss wurden 40 ml steriles, kaltes bidest. H₂O zu den Zellen gegeben und diese für 5 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nachdem die Zellen mit 25 ml sterilem, kaltem bidest. H₂O gewaschen und abzentrifugiert (5 min; 4000 rpm; 4°C) wurden, erfolgte ein letzter Waschschriff mit 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol und erneutes Zentrifugieren. Schließlich wurden die Zellen in 100 µl eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert. Zur Transformation der kompetenten *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis*-Zellen mittels Elektroporation wurden 40 µl der Zellsuspension mit 6 µl linearem DNA-Fragment gemischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, Peqlab, Erlangen) gegeben und bei 1,6 kV elektroporiert. Anschließend wurden die transformierten *Candida*-Zellen in 1 ml sterilem, kaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (2 min; 4.000 rpm). Das Zellpellet wurde dann in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und für 4-6 h bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl der Suspension auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und 2 d bei 30°C bebrütet. Bei Transformationen mit *C. albicans*-Zellen wurden dafür YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin und bei *C. dubliniensis*-Zellen YPD-Platten mit 50 µg/ml Nourseothricin gewählt.

2.6.9 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Candida*-Zellen wurden zunächst 10 ml YPD-Medium (YPD-Medium mit 100 µg/ml Nourseothricin bei Nourseothricin-resistenten Stämmen) mit je einer Kolonie beimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 1 ml bidest. H₂O wurden die Zellen in einem 2 ml Reaktionsgefäß aufgenommen, zentrifugiert (2 min; 4000 rpm) und schließlich in 1 ml Lyticase-Puffer (1 M Sorbitol; 100 mM Natriumacetat pH 5,8; 50 mM EDTA pH 8,0; 2 % β-Mercaptoethanol; 500 U/ ml Lyticase) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min; 13000 rpm), in 800 µl Proteinase-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM EDTA pH 7,5; 0,5% SDS; 1 mg/ml Proteinase K) gelöst und bei 60°C für weitere 30 min inkubiert. Hiernach wurde die DNA durch Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation (5 min; 13000 rpm) konnte die wässrige

Phase mit 700 µl Isopropanol in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt, abzentrifugiert und so die DNA gefällt werden. Das DNA-Pellet wurde dann mit 600 µl 70% Ethanol gewaschen, der Überstand gründlich abgezogen und zur vollständigen Entfernung des Ethanols einige Minuten an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die chromosomale DNA in 80 µl bidest. H₂O + 2 µl RNaseA (50 mg/ml) gelöst und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert.

2.6.10 Southern-Hybridisierung

Mit Hilfe der Southern-Hybridisierung wird die per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran übertragen, um dann mit markierten Sonden komplementäre DNA zu detektieren (Southern, 1975). Dafür wurden in einem 30 µl Restriktionsansatz zunächst chromosomale DNA (etwa 10 µg) von *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis* mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen über Nacht bei 37°C gespalten. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte anschließend auf einem 1%igem Agarosegel bei 32-36 V in 1x TAE-Laufpuffer (50x TAE-Stocklösung: 242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l dest H₂O) ebenfalls über Nacht. Für die spätere Größenbestimmung wurde ein Größenmarker (1 kb DNA-Leiter bzw. 1 kb plus DNA-Leiter; Invitrogen) mit aufgetragen. Die korrekte Auftrennung der DNA-Fragmente konnte nach Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht dokumentiert werden und die DNA dann mit Hilfe eines Vakuumbloiters auf eine Nylonmembran transferiert werden. Dafür wurde die Membran zuvor für 1 min in bidest. H₂O angefeuchtet und 5 min in 20x SSC (3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat) geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel unter Vakuum nacheinander für je 15 min mit 3 verschiedenen Lösungen behandelt: Lösung A (0,25 M HCl) zur Depurinisierung der DNA, Lösung B (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) für eine Denaturierung und schließlich Lösung C (1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl pH 5,1) zur Neutralisierung. Hiernach erfolgte der eigentliche Transfer der DNA auf die Membran durch eine 90-minütige Behandlung mit 20x SSC. Abschließend wurde die Membran für je 30 sec in 0,4 N NaOH sowie 0,2 M Tris/HCl pH 7,5 geschwenkt und die DNA mittels UV-Crosslinker fixiert. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte gemäß den Herstellerangaben des „Amersham ECL Direct Labeling and Detection System“ (GE Healthcare). Dafür wurde die Membran zunächst mit 2x SSC angefeuchtet und in einem Rotationsofen bei 42°C mit der ECL-Hybridisierungslösung für 1-2 h vorhybridisiert. Etwa 100 ng eines gelgereinigten DNA-Fragmentes wurden mit der Meerettich-Peroxidase markiert und dienten so als Sonde. Nach einer Hybridisierung über Nacht wurde die

Membran 1x 20 min und 2x 10 min im Hybridisierungsröhrchen bei 42°C mit Waschpuffer I (0,5x SSC; 0,4% SDS; 6 M Harnstoff) gewaschen. Zwei weitere Waschschrte je 5 min mit Waschpuffer II (2x SSC) bei Raumtemperatur schlossen sich an, bis die Membran schließlich für 1 min mit der Detektionslösung behandelt und in Frischhaltefolie verpackt wurde. Die ECL-Filme (Amersham Hyperfilm ECL) wurden je nach Stärke des Signals zwischen 10-120 min exponiert. Eine Rehybridisierung konnte frühestens nach 24 h, nach kompletter Eliminierung des restlichen Signals, durchgeführt werden. Dafür wurde die Membran kurz mit 2x SSC gewaschen und mit einer anderen Sonde, wie bereits beschrieben, hybridisiert.

2.6.11 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. albicans* und *C. dubliniensis*

Um mittels DNA-Microarrayanalyse und RNA-Sequenzierung ein globales Genexpressionsprofil von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während des Wachstums in Staib-Medium zu erhalten, wurde aus beiden *Candida*-Spezies RNA isoliert. In diesen Untersuchungen wurden als Kontrolle zum einen das Wachstum der Stämme in YPD-Medium verwendet und zum anderen die *C. albicans nrg1Δ*-Deletionsmutante, als ein Stamm, der in Staib-Medium, so wie *C. dubliniensis*, ebenfalls Chlamydosporen ausbildet. Zur RNA-Isolierung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum einen ein mechanischer Aufschluss der Zellen mit flüssigem Stickstoff und anschließender Isolation mittels „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, D), zum anderen wurde die „Hot Phenol-Methode“ angewandt.

In beiden Fällen wurden zunächst 50 ml YPD- bzw. Staib-Medium mit je einer Kolonie beimpft und für 28 h bei 25°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann in ein 50 ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5min; 4000 rpm; 4°C). Beim mechanischen Aufschluss wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren und das Pellet in einem Mörser mittels Stößel zermahlen. Anschließend erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA mit Hilfe des Qiagen-Kits nach dem Herstellerprotokoll. Bei der Phenol-Methode wurde das Pellet in 1 ml DEPC-H₂O (2 ml DEPC/ 1 l dest H₂O, über Nacht bei 37°C inkubiert, dann autoklaviert) gewaschen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und in 600 µl TES-Puffer (10 mM TRIS-Cl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5% SDS) aufgenommen. Hiernach wurde die Suspension mit 600 µl saurem Phenol vermischt, gevortext und für 1 h bei 65°C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend 5 min auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (5 min; 13000 rpm) und 600 µl der wässrigen Phase erneut mit 600 µl saurem Phenol gründlich vermischt sowie weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Erneutem

Abkühlen auf Eis (5 min) folgte Abzentrifugieren und das Extrahieren der wässrigen Phase in 600 µl neutralem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Hiernach wurde die RNA in 1 ml Ethanol (99 %, reinst) und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) auf Eis für 10 min präzipitiert, mit 70% Ethanol gewaschen, kurz an der Luft getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Reinigung der gewonnenen RNA erfolgte im Anschluss mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ von Qiagen. Hierfür wurde die RNA zunächst gründlich mit 350 µl RLT-Puffer und 250 µl Ethanol (99 %, reinst) vermischt, auf eine Zentrifugationssäule gegeben und 15 sec bei 13000 rpm abzentrifugiert. Für die Entfernung chromosomaler DNA, wurde diese mittels „RNase-Free DNase Set“ (Qiagen) auf der Säule verdaut. Dazu wurde die Säule mit der RNA zunächst für 5 min mit 350 µl RW1-Puffer behandelt, zentrifugiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur mit 80 µl DNase I-Mix inkubiert. Anschließend wurde die RNA auf der Säule nochmals mit 350 µl RW1-Puffer behandelt, zentrifugiert und 2x mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde gründlich entfernt und die Säule auf ein frisches, RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule, 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und abschließender Zentrifugation (1 min; 13000 rpm) konnte die aufgereinigte RNA-Lösung schließlich im Reaktionsgefäß aufgenommen werden. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop oder Bioanalyzer bestimmt. Die Aufbewahrung der RNA-Lösung erfolgte bei -80°C.

2.6.12 Prüfung von Qualität und Quantität der RNA

Eine Qualitäts- bzw. Quantitätsprüfung der isolierten Gesamt-RNA konnte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies und der mitgelieferten Software durchgeführt werden. Für die jeweilige Analyse der Proben wurde das „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ sowie die RNA Nano Chips von Agilent Technologies genutzt. Hierfür wurde je 1 µl isolierter RNA in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und im Thermocycler bei 70°C für 2 min inkubiert. Die Probenchips wurden nach dem Herstellerprotokoll behandelt und beladen. Für die weitere Verwendung sollte die Konzentration der Gesamt-RNA mindestens 200 ng/µl betragen.

2.6.13 Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Mit einer quantitativen RT-PCR kann im Vergleich zu einer konventionellen PCR die Menge des PCR-Produktes bestimmt werden. Für die Durchführung sind genspezifische Primer und Hybridisierungs sonden erforderlich.

In dieser Arbeit wurde für die qRT-PCR der DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green (KitBrilliant III Ultra Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix, Agilent Technologies) verwendet. Für die *C. dubliniensis*-Gene *CD36_15800*, *CD36_30750*, *CD36_40770* und *CdCSR1* sowie für die *C. albicans*-Gene *orf19.3512* und *orf19.4170* wurde die Expression ermittelt. Als endogene Kontrolle diente das *C. albicans*- bzw. *C. dubliniensis* *ACT1*-Gen. Dafür wurde zunächst je 1 µl der zu untersuchenden RNA (100 ng/µl) in Duplikaten auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Mx3000P) von Agilent Technologies vorgelegt. Alle anderen Bestandteile wurden in einem Master-Mix (Tabelle 6) angesetzt und je 19 µl zur RNA pipettiert. Anschließend wurden die Platten mit Optical Cap Strip (Agilent Technologies) verschlossen und gründlich durch Vortexen gemischt. Nach Zentrifugation (2 min; 300 x g) wurde die belegte 96-Well-Platte im Stratagene Mx 3005P von Agilent Technologies und der entsprechenden Software analysiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 und das verwendete Temperaturprofil in Tabelle 7 aufgelistet.

Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte über die Excel®-Funktion „STABWN“, die des Signifikanzwertes p über den TTEST.

Tabelle 6: Master-Mix für die qRT-PCR. (1 Ansatz = 19 µl)

Volumen	Reagenzien/Konzentration
5,8 µl	Aqua dest.
1,0 µl	10 pM forward-Primer
1,0 µl	10 pM reverse-Primer
0,2 µl	100 mM DTT
1,0 µl	RT/RNase Block
10 µl	SYBR® Green

Tabelle 7: Temperaturprofil der qRT-PCR.

Anzahl Zyklen	Segment	Zeit	Temperatur
1 Zyklus	Segment1	10 min	50 °C
	Segment2	3 min	95°C
40 Zyklen	Segment3	30 sec	95 °C
		30 sec	60 °C
1 Zyklus	Segment 4	1 min	95 °C
		30 sec	55 °C
		30 sec	95 °C

2.7 Genexpressionsanalyse

2.7.1 Analyse der Genexpression mittels Microarray

Durch den Einsatz von Microarrays kann eine umfassende Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene ermöglicht werden. Dabei können einzelne Gene identifiziert werden oder sich ganze Expressionsmuster abzeichnen, die nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Microarrays basieren auf der Hybridisierung der markierten einzelsträngigen cRNA-Stücke aus den Proben an ihren komplementären Gegenpart auf dem Array. Die *C. dubliniensis*-Microarrays wurden von der Firma „febit biomed GmbH“ (jetzt: CBC Comprehensive Biomarker Center GmbH) (Heidelberg) durchgeführt. Als Biochips wurden Glas-Silikon-Glas (sandwich) Chips verwendet. Jedes Gen einer Probe wurde in Duplikaten auf dem Array synthetisiert (technisches Replikat).

Die *C. albicans*-Microarrays wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Hube (HKI; Abteilung MPM: Mikrobiologische Pathogenitätsmechanismen), mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Ronny Martin (ehemals HKI; Abteilung MPM: Mikrobiologische Pathogenitätsmechanismen), durchgeführt. Dabei handelt es sich um kommerziell erhältliche Oligonukleotid-Glas-Arrays (Eurogentec), die für 6606 bekannte ORFs die Oligonukleotide jeweils in Duplikaten enthalten (technisches Replikat). Jedes Microarray-Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt (biologisches Replikat). Alle Proben wurden in Zweifarbexperimenten zusammen mit der gemeinsamen Referenz für *C. albicans* hybridisiert. Bei dieser Referenz handelt es sich um RNA, die aus einer

exponentiell wachsenden Kultur von *C. albicans* in YPD-Medium isoliert wurde. Hierfür wurde eine Übernachtskultur der Hefe in frisches YPD-Medium überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 5,0 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die so erhaltene Referenz-RNA wurde nach den folgenden Protokollen mit Cy3-Nukleotiden markiert und für die Microarray-Experimente eingesetzt. Die RNA-Isolierung bzw. experimentellen Bedingungen erfolgten wie unter 2.6.11 bzw. 3.1.2 beschrieben. Für alle Microarray-Experimente wurde die RNA mittels mechanischen Aufschlusses der Zellen mit flüssigem Stickstoff und anschließend mit Hilfe des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert.

Die Markierung der RNA erfolgte mit dem „Low RNA Input Linear Amplification Kit“ (Agilent Technologies). Dafür wurde diese nach Herstellerangaben mit fluoreszierenden Nukleotiden amplifiziert und dabei markiert. Hierzu wurde je 1 µg RNA mit Oligo-dt/T7-Promotor-Primern revers transkribiert und die so erhaltene cDNA mit Hilfe von Cy-markierten Nukleotiden (Cy3- bzw. Cy5-CTP; GE Healthcare) *in vitro* transkribiert.

Die erhaltene cRNA wurde mit dem „RNeasy Mini-Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und auf ihre spezifische Aktivität und Menge mit Hilfe des Nanodrop-1000-Spektrometers untersucht. Für die Hybridisierung wurde nur markierte cRNA mit einer Aktivität von mehr als 5 pmol/µg Cy-markierten Nukleotiden verwendet. Die Lagerung der markierten cRNA erfolgte in Wasser bei -80°C. Für die Hybridisierung wurden je 1 µg cRNA von der Probe (Cy5) und der gemeinsamen Referenz (Cy3) in 50 µl DIG EasyHyb (Roche) verdünnt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Arrays mit einem LifterSlip-Deckglas (Erie Scientific) bedeckt und die cRNA-Lösung konnte darunter gegeben werden. Nun wurden die Microarrays in einer Hybridisierungskammer (Corning) wasserdicht verschlossen und im Wasserbad bei 42°C für 16-20 h hybridisiert. Abschließend wurden die Arrays in 3 verschiedenen Schritten gewaschen (15 min in 2× SSC, 1 % SDS; 8 min in 1× SSC, 0,2 % SDS; 5 min in 0,1× SSC, 0,2% SDS) und zum Trocknen in einem 50 ml Gefäß abzentrifugiert (5 min; 450 g). In einem GenePix 4000B-Zweifarbscanner und einer Auflösung von 10 µm mit der GenePix-Software, Version 4.1 (Molecular Devices) wurden die Hybridisierungen auf den Microarrays letztlich erfasst und verarbeitet. Die Quantifizierung der hybridisierten cRNA erfolgte durch Scannen mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (Cy3: 532 nm und Cy5: 640 nm). Eine Aussage über die Expression jedes einzelnen Gens ist schließlich durch den Vergleich der Signalintensitäten der beiden Wellenlängen möglich.

Alle *C. albicans* Microarrays wurden von Dr. Jörg Linde (HKI; Abteilung: Systembiologie/Bioinformatik) ausgewertet. Zudem wurden dort auch die *C. dubliniensis*

Arrays mit den *C. albicans* Arrays verglichen. Bei *C. albicans* wurde für die Analysen nach GO-Termen auf die umfangreiche Annotation der „Candida Genome Database“ (Arnaud *et al.*, 2005) und für *C. dubliniensis* auf die „GeneDB“ zurückgegriffen (Hertz-Fowler *et al.*, 2004).

(<http://old.genedb.org/genedb/cdubliniensis/>; <http://www.candidagenome.org/>) (Stand: Juli 2009)

2.7.2 Analyse der Genexpression mittels RNA-Sequenzierung

Eine Alternative zur etablierten Microarray Methode bildet die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) auf Basis von Next Generation Sequencing Techniken, die eine weitaus präzisere Messung von Transkripten, Transkriptmengen und –isoformen ermöglicht (Wang *et al.*, 2009). Weitere Vorteile gegenüber der Microarray-Technologie bestehen in der Charakterisierung von noch unbekannten Transkripten, während Arrays an die Verfügbarkeit von bereits vorhandenen Sequenzdaten gebunden sind. RNA-Seq basiert im Vergleich zum Microarray nicht auf einer Hybridisierungsreaktion, sondern auf der Sequenzierung der in cDNA umgeschriebenen mRNA. Dabei gibt es verschiedene Sequenziertechnologien wie z. B. 454/Roche FLX System, Illumina/Solexa oder ABI/SOLiD, die man nach ihren Leseleistungen unterscheidet. Techniken, die kurze Sequenzen generieren und eine massive Parallelisierung aufweisen (z. B. Illumina System mit Leselängen von etwa 36 Basenpaaren und bis zu 50 Millionen Reaktionen gleichzeitig) und Methoden mit Leselängen bis zu 400 Basenpaaren, dafür aber weniger parallelen Reaktionen (z. B. 454-Pyrosequenzierung/Roche mit 1 - 2 Millionen Reaktionen) (Artikel: M. Eckerstorfer, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sequenzierung der RNA von PD Dr. Johann Weber (Lausanne Genomic Technologies Facility, Génopode-UNIL, Lausanne, Switzerland) unter Verwendung des Illumina-Protokolls „Directional mRNA-Seq Sample Preparation“ (Part # 15018460 Rev. A) durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion lief in 80 Zyklen für jede Probe und wurde auf dem „GenomeAnalyzer IIX“ (Illumina) durchgeführt. Im Folgenden ist eine vereinfachte Darstellung der Illumina-Technik aufgeführt (Artikel: M. Eckerstorfer, 2012). Dabei wird die cDNA in Fragmente von mehreren hundert Basenpaaren zerlegt und diese wiederum mit einem Linker ligiert. Die DNA-Moleküle werden anschließend an komplementäre Linker (Ankerlinker) auf der Reaktionsplatte gebunden und amplifiziert. So entsteht an einer definierten Position auf der Platte ein Cluster von identischen DNA-Molekülen. Die Platte wird schließlich mit allen 4

Nukleotiden (A, T, C, G) überspült, wobei jedes Nukleotid mit einem anderen Farbstoff markiert ist. Das entsprechende Nukleotid wird in den komplementären Strang eingebaut und ein im Nukleotid eingebauter Syntheseblocker stoppt die Reaktion. Folglich kann die Fluoreszenz in jedem Cluster gemessen werden und nach entfernen des Syntheseblockers ein neuer Zyklus beginnen. Durch die Abfolge der detektierten Fluoreszenzfarben kann die Sequenz in jedem DNA-Cluster bestimmt werden. Bei dieser Methode werden etwa 36 bp lange Sequenzen generiert, jedoch ergibt sich bei bis zu 50 Millionen Clustern eine Gesamtsequenz von > 1 Milliarde Basen pro Analyse.

2.8 Funktionelle Analyse der hergestellten Mutanten-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Deletionsmutanten, Überexpressionsstämmen und GFP-Reporterstämmen hergestellt (Tabelle 2). Um diese phänotypisch näher zu charakterisieren wurden verschiedene funktionelle Untersuchungen durchgeführt.

2.8.1 Verdünnungstropftests

Das Screening nach Phänotypen der Mutanten von *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurde in Form eines seriellen Verdünnungstropftests durchgeführt. So ist ein einfacher Vergleich des Wachstums verschiedener Stämme mit dem entsprechenden Wildtyp Stamm, bei unterschiedlich gewählten Bedingungen, möglich. Hierfür wurden die jeweiligen Transformanten in 10 ml YPD-Medium über Nacht bei 30 °C schüttelnd kultiviert. Nach der Anzucht der Zellen wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10 hergestellt. Die Verdünnungen wurden jeweils mit sterilem bidest. H₂O vorgenommen. Von den Verdünnungsstufen 10⁻³ bis 10⁻⁶ wurden dann 4 µl auf die verschiedenen zu testenden Agarplatten pipettiert und je nach zu untersuchender Bedingung bei 25, 30, 37 oder 42°C für 2-3 d inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einer Digitalkamera (Tabelle 4) fotografiert. Für alle Tropftests wurde das SD, Staib- oder YPD-Medium entsprechend den Angaben im Ergebnisteil supplementiert.

2.8.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der *GFP*-Expression

Eine Fluoreszenz von *C. albicans* und *C. dubliniensis*-Zellen, die das *GFP*-Reportergen exprimieren, wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss Axio-Observer. Z1 nachgewiesen. Dafür wurden die *C. dubliniensis* GFP-Reporterstämme Cd30750G1 und Cd40770G1 in einer Übernachtskultur in YPD-Medium angezogen, in Staib-Medium überimpft und für 28 h bei 25°C inkubiert. Des Weiteren wurden die zu testenden Stämme auch auf Staib-Agarplatten und auf Reisextrakt-Agarplatten ausgestrichen und für 2-3 d bei 25°C kultiviert. Für die Reisextrakt-Platten wurden die Stämme zusätzlich teilweise mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die *C. albicans* GFP-Reporterstämme Ca3512G1 und Ca4170G1 wurden ebenfalls auf Reisextrakt-Platten ausgestrichen, teilweise mit einem Deckgläschen bedeckt und für 2-3 d bei 25°C kultiviert. Für eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurden Aliquots der zu untersuchenden *C. dubliniensis*-Kulturen aus dem Staib-Flüssigmedium auf Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Bei den Agarplatten wurde eine Kolonie auf dem Objektträger in 5 µl bidest. H₂O aufgenommen und ebenso mit einem Deckglas bedeckt.

3 Ergebnisse

Mit dem Ziel neue Einblicke in die morphologische Vielseitigkeit von *Candida*, speziell der Chlamydosporenentwicklung, zu bekommen, wurde in dieser Arbeit ein globales, vergleichendes Transkriptionsprofil von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während des Wachstums in Staib-Medium erstellt. Dies geschah mit Hilfe von RNA-Sequenzierung und DNA-Microarrayanalysen. Ausgewählte Kandidaten der dabei identifizierten Gene in *C. albicans* und *C. dubliniensis* wurden sowohl in ihrer Rolle bezüglich der Chlamydosporenbildung, als auch im Hinblick auf Stressresistenz funktionell untersucht. Darüber hinaus war es von Interesse weitere Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen beiden *Candida*-Spezies zu charakterisieren.

3.1 Morphologie von *C. albicans* und *C. dubliniensis*

C. albicans und *C. dubliniensis* unterscheiden sich von anderen *Candida*-Spezies durch die Fähigkeit echte Hyphen und Chlamydosporen auszubilden. Während *C. albicans* auf Staib-Agar in seiner Hefeform wächst, ist *C. dubliniensis* in der Lage Chlamydosporen zu entwickeln (Sonneborn *et al.*, 1999; Staib und Morschhäuser., 1999). Zudem führt eine Deletion von *NRG1* in *C. albicans* auf Staib-Agar zur Ausbildung von Pseudohyphen und Chlamydosporen und in YPD-Medium zu einem konstitutiven Wachstum von Pseudohyphen (Braun *et al.*, 2001; Murad *et al.*, 2001b, Staib und Morschhäuser, 2005). Mit diesem Wissen wurden zu Beginn der Untersuchungen die experimentellen Bedingungen für die RNA-Sequenzierung und die DNA-Microarrays festgelegt. Im Folgenden sind diese näher beschrieben.

3.1.1 Wachstum von *C. dubliniensis*, *C. albicans* und *C. albicans nrg1Δ* in Staib-Flüssigmedium

Wie unter 3.1 aufgeführt, bilden der *C. dubliniensis* Wildtyp und die *C. albicans nrg1Δ*-Mutante, im Gegensatz zum *C. albicans* Wildtyp, auf Staib-Agar Chlamydosporen aus. Da eine Kultivierung der Stämme in Flüssigmedium die nötige RNA-Isolierung für die geplante Transkriptomanalyse erleichtert, wurde zunächst das Wachstum der drei zu analysierenden Stämme in Staib-Flüssigmedium überprüft (Abbildung 3). Wie auch auf

Staib-Agar bilden der *C. dubliniensis* Wildtyp und die *C. albicans nrg1Δ*-Mutante in Staib-Flüssigmedium Chlamydosporen aus. Das Wachstum in YPD-Medium wurde als Kontrolle mitgeführt. Man erkennt, dass die Ausbildung von Chlamydosporen in Staib-Medium spezifisch in der *nrg1Δ*-Mutante induziert wird, was das Wachstum der Stämme in Staib-Medium zu einer geeigneten Bedingung macht, um mögliche chlamydosporenspezifische Gene zu identifizieren.

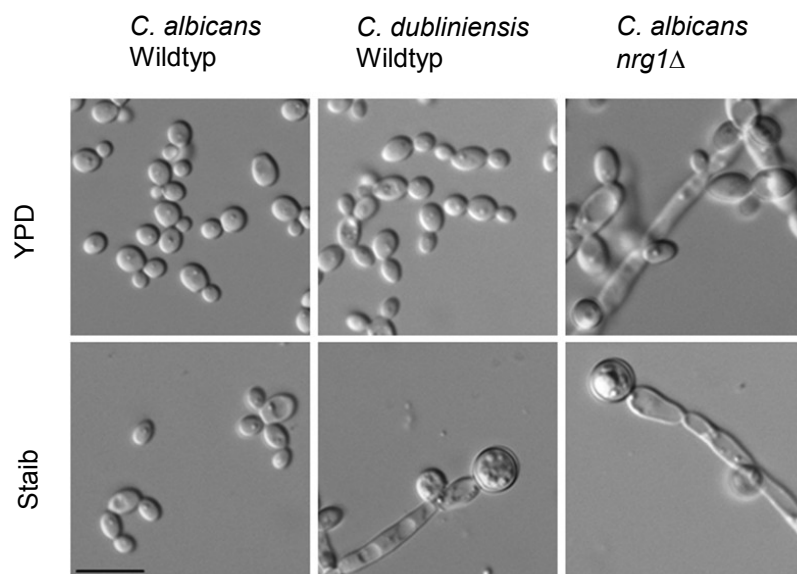


Abb. 3: Wachstum der zu untersuchenden *Candida*-Stämme in Staib-Medium. *C. dubliniensis* Wü284 und *C. albicans nrg1Δ* MMC3 bilden im Vergleich zum *C. albicans* SC5314 gleichermaßen Chlamydosporen aus. Die Stämme wurden in Staib-bzw. YPD-Medium (Kontrolle) bei 25°C für 28 h kultiviert. Maßstabsbalken: 10 µm.

3.1.2 Evaluierung experimenteller Parameter

Des Weiteren wurde ein geeigneter Zeitpunkt für die RNA-Isolierung/Transkriptomanalyse gesucht, in der die Stämme bereits Chlamydosporen bilden bzw. die Ausbildung der Chlamydosporen in einem ähnlichen Entwicklungsstadium ist. Um den optimalen Zeitpunkt der Chlamydosporenausbildung im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante zu ermitteln, wurden eine Vielzahl von unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht. So wurden nach einer Kultivierung von 18, 22 bzw. 24 h im Staib-Medium bereits Chlamydosporen beim *C. dubliniensis* Wildtyp identifiziert, die *C. albicans nrg1Δ*-Mutante zeigte zu diesen Zeitpunkten noch sehr junge bzw. kleine Chlamydosporen (Abbildung 4). Schließlich wurde ein 28-stündiges Wachstum der Stämme bei 25°C im Staib-Medium als die ideale Bedingung für die RNA-Sequenzierung

und die DNA-Microarrays festgelegt, da hier sowohl der *C. dubliniensis* Wildtyp als auch die *C. albicans nrg1Δ*-Mutante voll ausgebildete Chlamydosporen aufzeigten (Abbildung 4). Zusätzlich wurden für die DNA-Microarrayanalyse die drei zu untersuchenden Stämme in YPD-Medium (28 h, 25°C) inkubiert, um bei der Auswertung hyphenspezifische (*C. albicans nrg1Δ*-Mutante bildet Pseudohyphen im YPD-Medium)- und mediumsspezifische Gene auszuschließen und so den Kreis der möglicherweise chlamydosporenspezifischen Gene einzugrenzen.

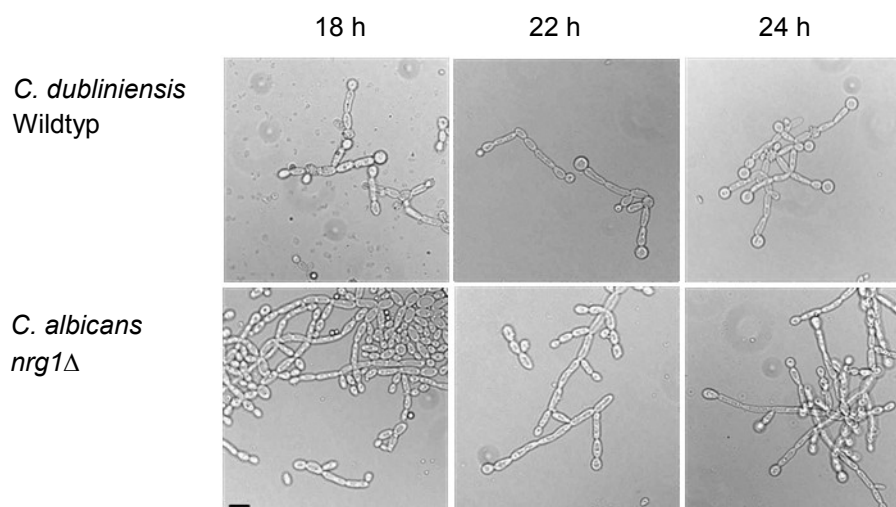


Abb. 4: Wachstum des *C. dubliniensis* Wildtyps und *C. albicans nrg1Δ*-Mutante nach 18-, 22- und 24-stündiger Inkubation in Staib-Medium bei 25°C. Maßstabsbalken: 10 µm.

3.2 Differentielle Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung

Um weitere Einblicke in die Genregulation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während der Entwicklung von Chlamydosporen zu bekommen und möglicherweise derartige spezifische Marker zu identifizieren, wurde im Folgenden erstmals ein globales Transkriptionsprofil der Wildtypen *C. albicans* und *C. dubliniensis* sowie der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen erstellt. Dafür wurde in dieser Arbeit eine RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) in Zusammenarbeit mit PD Dr. Johann Weber (Lausanne Genomic Technologies Facility, Génopode-UNIL, Lausanne, Switzerland) unter Anwendung der Illumina-Technik durchgeführt. Diese ist näher im Material und Methoden Teil beschrieben. Die RNA des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314, des *C. dubliniensis* Wildtypstammes Wü284 und des *C. albicans* Stammes MMC3 (*nrg1Δ*) wurde dazu nach 28-stündiger Inkubation in Staib-Medium (25°C) isoliert.

Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe von Dr. Jörg Linde (HKI; Abteilung: Systembiologie/Bioinformatik) ausgewertet, so dass eine Identifikation möglicher differentiell regulierter Gene unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen möglich war. Die Transkriptionshäufigkeit ausgewählter Gene wurde ferner durch quantitative Real-Time-RT-PCR genauer ermittelt.

3.2.1 Differentiell regulierte Gene in Staib-Medium

Eine erste Auswertung der RNA-Seq zeigte, dass in Staib-Medium in *C. dubliniensis* Wü284 443 und in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante 271 Gene ≥ 2 -fach herauf reguliert (Fold Change ≥ 2) waren. Von den insgesamt 608 Genen waren dabei 106 Gene in beiden Stämmen differentiell herauf reguliert (Abbildung 5A). Des Weiteren wurden 1202 Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp und 57 Gene in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante identifiziert, die ≥ 2 -fach herab reguliert waren. Darunter waren 21 Gene in beiden Stämmen (in Staib-Medium) differentiell herab reguliert (Abbildung 5B).

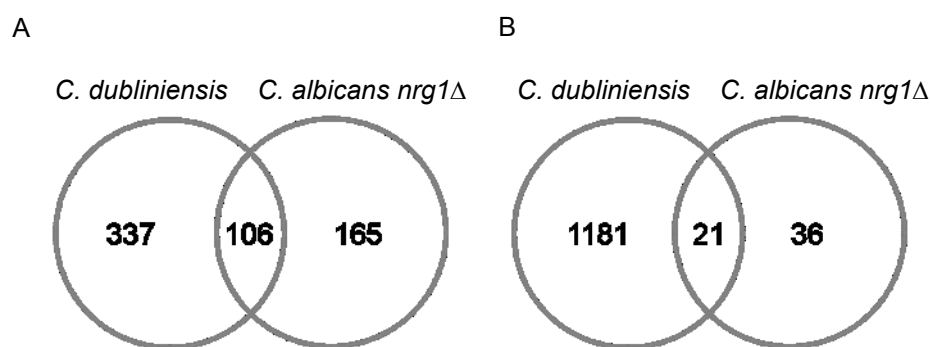


Abb. 5: Venn-Diagramm der ≥ 2 -fach herauf (A) und herab (B) regulierten Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante.

Um die Anzahl der möglichen chlamydosporenspezifischen Gene weiter einzugrenzen, wurde bei der Auswertung der RNA-Seq ein weiterer Filter verwendet: „MAID-filtering“ (MA-plot-based signal intensity-dependent fold-change). Der Vorteil dieses Filters besteht darin, dass Gene, die sehr gering exprimiert werden, hierbei nicht als „differentiell reguliert“ definiert werden und somit eine übersichtliche Aufstellung der am stärksten regulierten Gene erstellt werden kann (Hecker *et al.*, 2009). So wurde im Vergleich der differentiell exprimierten Gene in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante mit dem *C. albicans* Wildtyp und dem *C. dubliniensis* Wildtyp mit dem *C. albicans* Wildtyp schließlich ein Set von putativ chlamydosporenspezifischen Genen erstellt. Hierbei konnten insgesamt 25

Gene identifiziert werden, die im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante herauf reguliert (Abbildung 6A) und 8 Gene, die herab reguliert wurden (Abbildung 6B). In Tabelle 7 sind diese Gene aufgelistet.

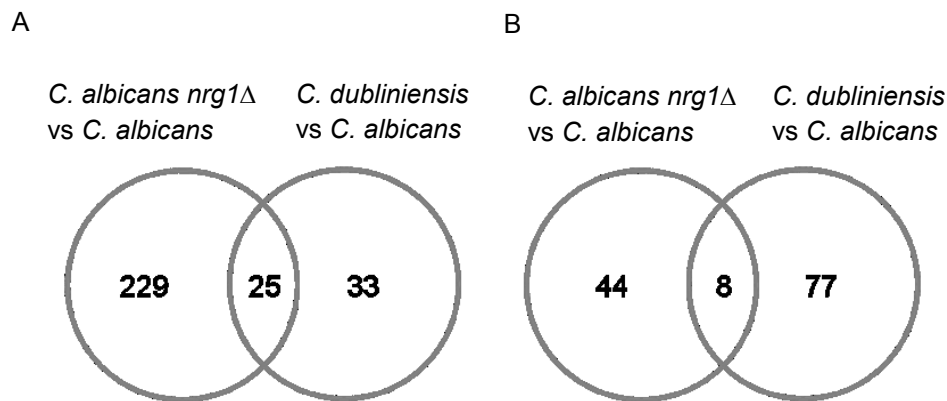


Abb. 6: Venn-Diagramm der stark herauf (A) und herab (B) regulierten Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante im Vergleich zum *C. albicans* Wildtyp (MAID-filtering).

Da mit dieser Arbeit erstmals ein globales Transkriptionsprofil unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen erstellt wurde, verwundert es nicht, dass die meisten der identifizierten Gene für Proteine mit noch unbekannter Funktion oder für uncharakterisierte/hypothetische Proteine kodieren. Wie bereits erwähnt ist der Hyphenrepressor Nrg1 für den unterschiedlichen Phänotyp von *C. albicans* und *C. dubliniensis* in Staib-Medium verantwortlich (Staib und Morschhäuser, 2005). Daher ist es ebenfalls nicht überraschend, dass einige der identifizierten Gene mit Filamentierung zu tun haben und/oder als ein putatives Zielgen von Nrg1 bereits bekannt sind. Das wären beispielsweise *PGA13*, *PGA55* und *IHD1*, die für Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine kodieren (de Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2009). Die Abkürzung *IHD1* steht zudem für „induced during hyphae development“ (Murad *et al.*, 2001b; Nantel *et al.*, 2002). Als weitere Zielgene sind das stark herauf regulierte Gene *orf19.6741*, mit bisher noch unbekannter Funktion, und *UME6* zu nennen. *UME6* ist in *C. albicans* als filamentspezifischer Regulator bekannt (Banerjee *et al.*, 2008; Zeidler *et al.*, 2009). O'Connor *et al.* zeigten, dass die unterschiedliche Filamentierung in *C. albicans* und *C. dubliniensis* durch die differentielle Expression von *UME6* beeinflusst wird.

NRG1 selbst wurde in dieser Analyse unter den stärksten herab regulierten Genen im *C. dubliniensis* Wildtyp verglichen mit dem *C. albicans* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium gefunden.

Tabelle 7: Stark herauf und herab regulierte (≥ 2 -fach) Gene in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und in *C. dubliniensis* im Vergleich zum *C. albicans* Wildtyp in Staib-Medium während der Chlamydosporenentwicklung.

<i>C. albicans</i> ID	Name	<i>C. dubliniensis</i> ID	Relative Expression (log ₂ fold)	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i> vs. <i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i> vs. <i>C. albicans</i>
<u>Herauf regulierte Gene:</u>				
orf19.3512		CD36_30750	9.60	17.20
orf19.654		CD36_30570	9.50	17.90
orf19.4170		CD36_40770	8.47	12.31
orf19.4463		CD36_03620	8.38	13.47
orf19.2317		CD36_10300	7.13	9.93
orf19.6315		CD36_30140	6.49	8.29
orf19.6420	"PGA13"	CD36_34100	6.47	6.93
orf19.2638		CD36_53200	6.44	9.25
orf19.4011		CD36_54780	6.20	10.82
orf19.2583		CD36_26850	5.61	5.83
orf19.6741		CD36_87380	5.35	8.82
orf19.207	"PGA55"	CD36_23160	4,84	6,93
orf19.3330.3	"POX18"	CD36_01320	4.34	7.04
orf19.3885		CD36_31810	3.93	7.48
orf19.4688	"DAG7"	CD36_41020	3.70	4.58
orf19.2457		CD36_05580	3,44	4,83
orf19.4783		CD36_08720	2.96	5.74
orf19.6569		CD36_71400	2.84	5.21
orf19.4264		CD36_52290	2.84	5.03
orf19.4459		CD36_03600	2.74	5.16
orf19.6920		CD36_71220	2.64	4.82
orf19.2506		CD36_80940	2.48	4.55
orf19.4953		CD36_12310	2.36	4.94
orf19.6788		CD36_87050	2.07	4.49
orf19.5645	"MET15"	CD36_87050	1.92	5.28
<u>Herab regulierte Gene:</u>				
orf19.508	"QDR1"	CD36_29520	-6.43	-6.32
orf19.4773	"AOX2"	CD36_08630	-6.03	-6.19
orf19.7150	"NRG1"	CD36_73890	-4.37	-4.98
orf19.7554		CD36_34960	-3.21	-5.31
orf19.1189		CD36_60240	-2.49	-5.49
orf19.2251	"AAH1"	CD36_21260	-1.78	-4.55
orf19.1193	"GNP1"	CD36_60280	-1.75	-4.99
orf19.4555	"ALS4"	CD36_64610	-1.63	-10.47

Besonders auffällig war außerdem, dass eine Vielzahl der herauf regulierten Gene für Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierte Gene kodieren. Dazu gehören unter anderem *PGA13* und *PGA55*, die hier bereits als Zielgene von *NRG1* erwähnt wurden. *PGA13* gehört zur Familie der Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteine (de Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2009) und ist unter anderem für die Ausbildung von normalen Oberflächeneigenschaften der Zellwand von Bedeutung (Gelís *et al.*, 2012). *PGA55* gilt als uncharakterisiert und kodiert mutmaßlich ebenfalls für ein GPI-verankertes Protein (de Groot *et al.*, 2003). Für *PGA55* ist weiter bekannt, dass es zum einen über *NRG1* und *TUP1* und zum anderen möglicherweise transkriptionell bei der Hyphenbildung reguliert wird (Kadosh *et al.*, 2005). Das *PGA13* Homolog *CD36_34100* in *C. dubliniensis* kodiert ebenso für ein putatives GPI-verankertes Protein, das *C. dubliniensis* Homolog *CD36_23160* für *PGA55* dagegen für ein hypothetisches Protein.

Weiterhin fielen besonders die ersten vier am stärksten herauf regulierten Gene in der *C. albicans* *nrg1Δ*-Mutante und deren *C. dubliniensis* Homologe auf (Tabelle 7). Alle diese Gene sind in *C. albicans* als uncharakterisiert beschrieben, in *C. dubliniensis* hingegen ebenfalls als putative Zellwandgene verzeichnet (<http://old.genedb.org/genedb/cdubliniensis/>; <http://www.candidagenome.org/>), wobei das 4. (*CD36_03620*) als Pseudogen angegeben ist. Dieses verstärkte Auftreten von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen innerhalb der Gruppe von möglichen chlamydosporenspezifischen Genen, legt die Annahme nahe, dass die Wand dieser speziellen morphologischen Strukturen höchstwahrscheinlich eine charakteristische Zusammensetzung an Proteinen beinhaltet.

Als weitere interessante Gene fielen solche auf, die zuvor in Verbindung mit „Switching“ oder „Mating“ in *C. albicans* gebracht wurden. Als Beispiel sind hier *DAG7* (ein sekretorisches Protein) und *orf19.2317* zu nennen. Die Expression dieser beiden Gene wird durch (α)Alpha-Pheromon induziert (Dignard und Whiteway, 2006). Darüber hinaus wurde *orf19.2506* als ein opaque-spezifisches Gen erwähnt (Tsong *et al.*, 2003). Die jeweiligen Homologen dieser Gene in *C. dubliniensis* sind bisher als hypothetische Proteine beschrieben.

Unter den 25 am stärksten exprimierten Genen können des Weiteren die Transportproteine *POX18* und *orf19.2583* genannt werden. In *C. albicans* kodiert *POX18* für ein Protein, welches dem peroxisomalen Protein Pox18 in *C. maltosa* Pox18 ähnlich ist. Das Homolog *CD36_01320* in *C. dubliniensis* ist als peroxisomaler Lipidtransporter beschrieben.

Orf19.2583 und das Homolog in *C. dubliniensis* wird als ein mutmaßlicher Peptidtransporter beschrieben (Lorenz *et al.*, 2004).

Nobile *et al.* (2003) untersuchten eine homozygote Insertionsmutantenbank auf mögliche Defekte hinsichtlich der Chlamydosporenausbildung. In diesem Zusammenhang wurden die Gene *SUV3*, *SCH9* und *ISW2* genannt. Mutantenstämme mit Insertionen in diesen Genen waren nicht mehr in der Lage Chlamydosporen auszubilden. In der Untersuchung dieser Arbeit wurden die drei Gene jedoch lediglich als schwach herab reguliert gefunden und waren nicht unter den möglichen chlamydosporenspezifischen Genen verzeichnet. *POX18* war ebenfalls ein Gen dieser Mutantenbank, zeigte jedoch in der Publikation von Nobile *et al.* keinen auffälligen Phänotyp.

Alonso-Monge *et al.* zeigten, dass auch die Stress-aktivierte Kinase Hog1 eine Rolle in der Chlamydosporenentwicklung bei *C. albicans* besitzt. *C. albicans hog1Δ*-Mutanten waren nicht mehr in der Lage Chlamydosporen auszubilden. In dieser Arbeit wurde *HOG1* im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante ebenfalls unter den herauf regulierten Genen gefunden. Ob *HOG1* während des Wachstums in Staib-Medium allerdings eine funktionelle Rolle spielt, bleibt spekulativ.

Unter den acht herab regulierten Genen fanden sich unter anderem *QDR1* und *GNP1*. In *C. albicans* kodiert *QDR1* für einen putativen Transporter, dessen Transkription über Nrg1 und Tup1 reguliert wird (Murad *et al.*, 2001a). Außerdem wird eine Expressionsregulation über das White-Opaque Switching beschrieben (Lan *et al.*, 2002). Das Homolog in *C. dubliniensis* ist als mutmaßlicher Plasmamembrantransporter der MDR-Familie (**multidrug resistance**) beschrieben. Das für *GNP1* kodierte Protein ist ähnlich einer Asparagin- und Glutaminpermease und wird u. a. transkriptionell über Nrg1, Mig1 und Tup1 reguliert (Murad *et al.*, 2001a). Das Homolog *CD36_60280* in *C. dubliniensis* kodiert für eine putative Glutaminpermease.

Nach dieser ersten Auswertung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung lässt sich zusammenfassend sagen, dass unter den 25 am stärksten exprimierten Genen eine Vielzahl von Genen identifiziert werden konnte, die für Proteine mit noch unbekannter Funktion oder für uncharakterisierte/hypothetische Proteine kodieren. Zudem wurde das Transkriptionsprofil deutlich von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen dominiert, was eine spezielle Zusammensetzung der Zellwand von Chlamydosporen vermuten lässt.

3.2.2 Sequenzspezifität der vier am stärksten herauf regulierten Gene während der Chlamydosporenausbildung

Die vier am stärksten herauf regulierten Gene in *C. albicans* und die entsprechenden Homologe in *C. dubliniensis* kodieren nicht nur für putative Zellwandproteine, sondern weisen darüber hinaus auch hohe Übereinstimmungen in ihren DNA-Sequenzen auf. (<http://old.genedb.org/genedb/cdubliniensis/>; <http://www.candidagenome.org/>; <http://emboss.open-bio.org/>). In Tabelle 8 sind diese vier *C. albicans* und *C. dubliniensis* Gene in ihrer DNA-Sequenz verglichen und aufgelistet worden. Dabei kann man zum Teil eine hohe Identität der vier Gene untereinander verzeichnen. Sehr viel stärker ist dies jedoch für die *C. dubliniensis* Gene mit den entsprechenden Homologen in *C. albicans*. Mit der spezifischen Expression dieser Gene während des Wachstums unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen und dem Wissen, dass nur *C. albicans* und *C. dubliniensis* in der Lage sind diese morphologischen Strukturen zu bilden, lag die Vermutung nahe, dass diese Gene spezifisch für *C. albicans* und *C. dubliniensis* sein könnten. Mit Hilfe des „Candida Gene Order Browser“ (GCOB) wurde diese Annahme überprüft (<http://cgob.ucd.ie/>; Fitzpatrick *et al.*; 2010). *orf19.3512* und *orf19.654* wurden dabei nur in *C. albicans* und *C. dubliniensis* gefunden und gelten somit als spezifisch für die beiden *Candida*-Spezies. Für das *C. albicans* Gen *orf19.4170* wurde neben einem Homolog in *C. dubliniensis* auch eines für *C. tropicalis* (CTRG_01767) gefunden. Ein Vergleich des *C. albicans orf19.4170* und dem *C. tropicalis CTRG_01767* auf Proteinebene ergab eine Identität von 38,9% und eine Ähnlichkeit von 47,7%, jedoch sind das *C. albicans* Gen *orf19.4170* und das *C. dubliniensis* Homolog CD36_40770 zu 83,8% identisch und zu 86,7% ähnlich (Tabelle 8). Ob das identifizierte Gen in *C. tropicalis* allerdings ein funktionelles Homolog von *orf19.4170* ist, bleibt fraglich, da *C. tropicalis*, soweit bekannt, nicht in der Lage ist Chlamydosporen auszubilden. Für *orf19.4463* wurde kein Homolog in anderen *Candida*-Spezies neben *C. dubliniensis* gefunden. Dort ist das Gen CD36_03620 als Pseudogen annotiert, welches eine Reihe von Stopp-Codons enthält. Die kodierten Proteine dieser Gene (*orf19.4463/ CD36_03620*) sind zu 30,6% identisch und zu 38,3% ähnlich, zeigen auf DNA-Ebene aber eine Gleichheit von 59,6% (Tabelle 8). Mit der Anwendung des GCOB konnte gezeigt werden, dass die identifizierten putativen chlamydosporenspezifischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* Gene nicht weit verteilt in der Gattung *Candida* auftreten. Diese Beobachtung unterstreicht zusätzlich die mutmaßlich spezifische Rolle dieser Gene während der Entwicklung von Chlamydosporen in *C. albicans* und *C. dubliniensis*.

Tabelle 8: Prozentangabe der Proteinsequenz-Identität für die vier am stärksten herauf regulierten Gene während der Chlamydosporenentwicklung

<i>C. dubliniensis</i> – <i>C. albicans</i>		Identität/Ähnlichkeit (%)	Identität (DNA) ^a (%)	
<i>CD36_30750</i> – <i>orf19.3512</i>		80,1/83,2	78,3	
<i>CD36_30570</i> – <i>orf19.654</i>		80,2/89,2	84,1	
<i>CD36_40770</i> – <i>orf19.4170</i>		83,8/86,7	82,0	
<i>CD36_03620</i> – <i>orf19.4463</i>		30,6/38,3	59,6	
<i>orf19.3512</i> ^b		<i>orf19.654</i>	<i>orf19.4170</i>	<i>orf19.4463</i>
<i>orf19.3512</i>		47,5	55,8	36,8
<i>orf19.654</i>	58,3		56,0	65,7
<i>orf19.4170</i>	60,2	67,9		51,4
<i>orf19.4463</i>	48,2	72,2	64,4	
<i>CD36_30750</i>		<i>CD36_30570</i>	<i>CD36_40770</i>	<i>CD36_03620</i>
<i>CD36_30750</i>		42,6	59,0	26,7
<i>CD36_30570</i>	56,6		60,4	40,5
<i>CD36_40770</i>	64,5	76,0		29,0
<i>CD36_03620</i>	38,0	47,4	37,2	

^a Prozentangabe der Identität für die *C. albicans* Gene und deren Homologe in *C. dubliniensis* auf DNA-Ebene.

^b Prozentangabe der Ähnlichkeit (unten links) und der Identität (oben rechts).

Auf der Suche nach chlamydosporenspezifischen Markern wurden schließlich zwei am höchsten regulierten putativen Zellwandgene ausgewählt. Das waren *CD36_30750/CD36_40770* und deren *C. albicans* Homologe *orf19.3512/orf19.4170*.

Basierend auf den im weiteren Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen wurden die Gene in *C. albicans* und *C. dubliniensis* als „Chlamydosporenspezifisches-Protein 1 und 2“, *Ca/CdCSP1* und *Ca/CdCSP2* bezeichnet und sind nachfolgend unter diesen Namen angegeben. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab (Tabelle 8), dass *CdCSP1* und dessen Homolog in *C. albicans* *CaCSP1* zu 80,1% identisch und zu 83,2% ähnlich sind (www.ebi.ac.uk). Die Homologe *CdCSP2* und *CaCSP2* sind sogar zu 83,8% identisch und zu 86,7% ähnlich.

3.2.3 Quantitative Real-Time-RT-PCR zum Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene

Der erste Teil der Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung führte zur Identifizierung einer Anzahl möglicher chlamydosporenspezifischer Gene. Dabei besonders auffällig war das Vorhandensein einer Vielzahl putativer Zellwandgene, die zudem in Staib-Medium hohe Expressionswerte aufzeigten. Um diese Expressionsdaten der mutmaßlich chlamydosporenspezifischen Gene genauer zu quantifizieren, wurde eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die Analyse erfolgte dabei für die Gene *CdCSP1*, *CdCSP2* und deren *C. albicans* Homologe *CaCSP1* und *CaCSP2* in drei biologischen Replikaten. Als endogene Kontrolle wurde für *C. albicans* und *C. dubliniensis* das jeweilige *ACT1*-Gen verwendet. Für alle Gene wurde die Darstellung des Fold Change (FC) gewählt. Ab einem FC von 1,5 gilt ein Gen als differentiell reguliert. Die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigten die starke Expression der beiden putativen Zellwandgene *CdCSP1* und *CdCSP2* im *C. dubliniensis* Wildtyp.

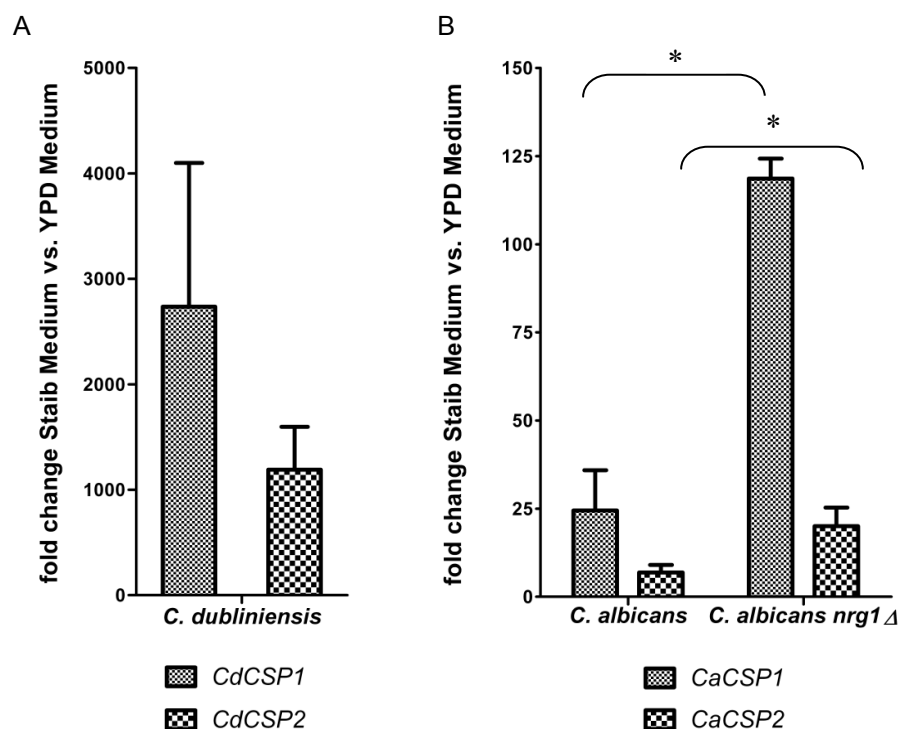


Abb. 7: qRT-PCR zur Überprüfung der Expression ausgewählter Gene. Dargestellt ist der Fold Change der Expression der Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* im *C. dubliniensis* Wildtyp (A) sowie deren Homologe *CaCSP1* und *CaCSP2* im *C. albicans* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante (B) nach 28-stündigem Wachstum der Stämme in Staib-Medium verglichen mit YPD-Medium (MW \pm SD; n=3; $P < 0.05$).

CdCSP1 wurde > 2800-fach und *CdCSP2* > 1200-fach im *C. dubliniensis* Wü284 während des Wachstums in Staib-Medium im Vergleich zum Wachstum in YPD-Medium hoch reguliert (Abbildung 7). Darüber hinaus waren die *C. albicans* Homologe *CaCSP1* und *CaCSP2* in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante signifikant ($P < 0.05$) stärker herauf reguliert verglichen mit dem *C. albicans* SC5314. *CaCSP1* wurde in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante > 120-fach und im *C. albicans* Wildtyp hingegen nur > 25-fach hoch reguliert. *CaCSP2* wurde in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante > 20-fach und im *C. albicans* Wildtyp > 6-fach herauf reguliert. Mit diesen Ergebnissen konnte eine Hochregulation der Gene während der Chlamydosporenbildung bestätigt werden, was ein möglicher Hinweis sein kann, dass diese Gene bzw. die durch diese Gene kodierten Proteine für Chlamydosporen spezifisch sind. Die zwei ausgewählten *C. albicans* und *C. dubliniensis* Gene sind daher vielversprechende Kandidaten für chlamydosporenspezifische Marker.

3.3 Lokalisation putativer chlamydosporenspezifischer Marker mittels GFP

3.3.1 Konstruktion von GFP-Reporterstämmen

In dieser Arbeit wurde erstmals ein Transkriptionsprofil mittels RNA-Sequenzierung für *C. dubliniensis* unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen erstellt. Unter den stark herauf regulierten Genen konnte dabei eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die für putative Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine kodieren, was eine spezielle Zusammensetzung der Zellwand von Chlamydosporen vermuten lässt. Für die weiteren Untersuchungen wurden zwei der am stärksten herauf regulierten Gene in *C. albicans* (*CaCSP1*; *CaCSP2*) und deren Homologe in *C. dubliniensis* (*CdCSP1*; *CdCSP2*) ausgewählt. Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnte deren erhöhte Expression während des Wachstums der Stämme *C. albicans* SC5314, *C. dubliniensis* Wü284 und des *C. albicans* Stammes MMC3 (*nrg1Δ*) in Staib-Medium bestätigt werden. Dabei lässt sich jedoch nicht sagen, ob diese unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen stark exprimierten Gene auch tatsächlich spezifisch für die Wuchsform Chlamydospore sind oder mit dem Hyphenwachstum assoziiert sind. Mit dem Ziel diese ausgewählten Gene einer morphologischen Struktur zuzuordnen bzw. deren exakte Lokalisation in der Zelle zu bestimmen, wurden DNA-Kassetten für Translationsfusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konstruiert und in eines der entsprechenden Allele der Zielgene im *C. dubliniensis* - bzw. *C. albicans* Wildtyp integriert. Dafür wurden

zunächst spezifische Reporter-kassetten für die Gene *CdCSP1/CdCSP2* und *CaCSP1/CaCSP2* in Plasmide kloniert. Durch Transformation des *C. dubliniensis* Wü284 bzw. des *C. albicans* SC5314 mit diesen Konstrukten war es möglich GFP-Reporterstämme für diese Gene herzustellen. Im Folgenden ist die Konstruktion der Plasmide und *C. dubliniensis* - bzw. *C. albicans*-Stämme beschrieben.

3.3.2 Konstruktion der Reporter-kassetten

Die Herstellung der Reporter-kassetten wird im Folgenden für das Gen *CdCSP1* exemplarisch beschrieben. Für die Gene *CdCSP2*, *CaCSP1* und *CaCSP2* wurden die Kassetten nach derselben Vorgehensweise hergestellt.

Der 5'upstream-Bereich und die kodierende Region des Gens *CdCSP1* wurden mit dem Primer-Paar CD36_30750-1/CD36_30750-5 per PCR amplifiziert, als Template wurde DNA des *C. dubliniensis* Wildtypstammes Wü284 verwendet. Der Primer CD36_30750-5 enthält eine *Bam*HI-Schnittstelle, die direkt anstelle des Stopp-Codons eingefügt wurde. Das *GFP*-Gen (ohne das Start-Methionin) wurde zunächst mit dem *C. albicans* Actin-Terminator (*T_{ACT1}*) fusioniert und das daraus resultierende Plasmid als pJetGFPACT1T1 bezeichnet. Dafür wurden die Primer GFP1 und CaACT1T-1 sowie das Plasmid pSSU1G2 als Template verwendet (Labor Staib). Das *Ap*aI/*B*amHI *CdCSP1*-Fragment wurde schließlich zusammen mit dem *B*amHI/*N*coI-*GFP*-Fragment aus pJetGFPACT1T1 in den *Ap*aI/*N*coI gespaltenen Vektor pSSU1G2 kloniert. In das daraus resultierende Plasmid pcdCSP1G1 wurde der downstream-Bereich kloniert. Für die Amplifizierung des downstream-Bereiches wurde das Primer-Paar CD36_30750-6 und CD36_30750-4 verwendet. Das entstandene PCR-Produkt wurde als *P*stI/*S*acI-Fragment in das *P*stI/*S*acI-gespaltene Plasmide pcdCSP1G1 ligiert. Das erhaltene Plasmid pcdCSP1G2 enthält eine Kasette mit einer *CdCSP1-GFP*-Fusion (das GFP-Protein ist ohne das Start-Methionin über zwei zusätzliche Aminosäuren [Gly-Ser] an die letzte Aminosäure von *CdCSP1* gekoppelt) zur Integration in den *CdCSP1*-Locus. Die Verwendung des *caSAT1*-Gens als Selektionsmarker nach der *C. albicans*-Transformation erlaubte ferner die Konstruktion der Reporterstämme im Wildtyp-hintergrund.

Alle Reporter-kassetten sind in Abbildung 8 dargestellt. In Tabelle 9 sind die verwendeten Templates, Primer, eingefügten Schnittstellen und die Konstruktionsweise der GFP-Reporter-kassetten aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Templates, Primer, eingefügte Schnittstellen und Konstruktionsweise der Reporter-kassetten für die Gene *CaCSP1*, *CaCSP2*, *CdCSP1*, *CdCSP2* und deren Vorstufen. Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Gens. (A von ATG = +1)

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_30750-1 CD36_30750-5	<i>Apa</i> I-site bei -385 <i>Bam</i> HI-site bei +1078	<i>Apa</i> I/ <i>Bam</i> HI-gespaltenes PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I <i>GFP</i> -Fragment in <i>Apa</i> I/ <i>Nco</i> I - gespaltenes pSSU1G2	pcdCSP1G1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_30750-6 CD36_30750-4	<i>Pst</i> I-site bei +1092 <i>Sac</i> I-site bei +1516	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdCSP1G1	pcdCSP1G2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_40770-1 CD36_40770-5	<i>Apa</i> I-site bei -448 <i>Bam</i> HI-site bei +820	<i>Apa</i> I/ <i>Bam</i> HI-gespaltenes PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I <i>GFP</i> -Fragment in <i>Apa</i> I/ <i>Nco</i> I - gespaltenes pSSU1G2	pcdCSP2G1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_40770-6 CD36_40770-4	<i>Pst</i> I-site bei +830 <i>Sac</i> I-site bei +1141	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdCSP2G1	pcdCSP2G2
<i>C. albicans</i> SC5314	Ca3512-1 Ca3512-2	<i>Apa</i> I-site bei -353 <i>Bam</i> HI-site bei +1063	<i>Apa</i> I/ <i>Bam</i> HI-gespaltenes PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I <i>GFP</i> -Fragment in <i>Apa</i> I/ <i>Nco</i> I - gespaltenes pSSU1G2	pCSP1G1
<i>C. albicans</i> SC5314	Ca3512-3 Ca3512-4	<i>Pst</i> I-site bei +1084 <i>Sac</i> I-site bei +1478	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pCSP1G1	pCSP1G2
<i>C. albicans</i> SC5314	Ca4170-1 Ca4170-2	<i>Apa</i> I-site bei -353 <i>Bam</i> HI-site bei +823	<i>Apa</i> I/ <i>Bam</i> HI-gespaltenes PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI/ <i>Nco</i> I <i>GFP</i> -Fragment in <i>Apa</i> I/ <i>Nco</i> I - gespaltenes pSSU1G2	pCSP2G1
<i>C. albicans</i> SC5314	Ca4170-3 Ca4170-4	<i>Pst</i> I-site bei +843 <i>Sac</i> I-site bei +1242	<i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Pst</i> I/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pCSP2G1	pCSP2G2

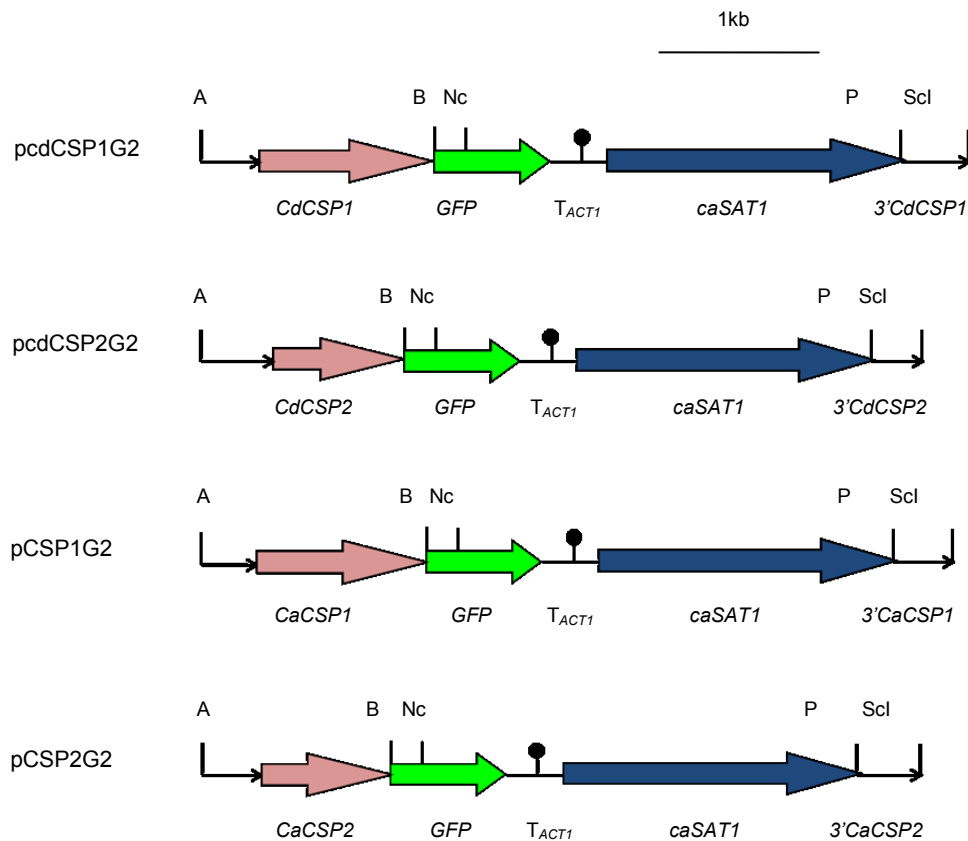


Abb. 8: GFP-Reporterkassetten der Gene *CdCSP1*, *CdCSP2*, *CaCSP1* und *CaCSP2*. Die linearen Transformationsfragmente können als *ApaI/SacI*-Fragmente aus den jeweiligen Plasmiden herausgespalten werden. Das *GFP*-Reporter-gen (Morschhäuser *et al.*, 1998) ist als grüner, der Selektionsmarker für die *Candida* Transformation das *caSAT1*-Gen als blauer Pfeil abgebildet. Die Terminatorsequenz des *ACT1*-Gens hinter dem Reporter-gen ist als schwarzer Kreis, die 3'-Region des jeweiligen Zielgens für die homologe Integration, als schwarze Linie dargestellt. Für die Klonierung relevante Schnittstellen sind angegeben: A, *ApaI*; B, *BamHI*; Nc, *NcoI*; P, *PstI*; Scl, *SacI*.

3.3.3 Konstruktion der GFP-Reporterstämme

Ziel der Herstellung der GFP-Reporterstämme in den zwei ausgewählten *C. albicans* und *C. dubliniensis* Genen, war die Lokalisation der durch diese Gene kodierten Proteine während der Bildung von Chlamydosporen. Dafür wurden die Ausgangsstämme SC5314 (*C. albicans*) und Wü284 (*C. dubliniensis*) verwendet. Diese wurden mit den linearen *ApaI/SacI*-Fragmenten aus den entsprechenden Plasmiden pcdCSP1G2, pcdCSP2G2 für *C. dubliniensis* und pCSP1G2 und pCSP2G2 für *C. albicans* transformiert. Dabei erfolgte die Integration der Reporter-kassetten in eines der homologen Allele der Zielgene im *C. dubliniensis*- bzw. *C. albicans* Wildtyp. Die entstandenen Stämme wurden als CdCSP1G1, CdCSP2G1, CaCSP1G1 und CaCSP2G1 bezeichnet. Nach allen Transformationen wurden je zwei unabhängige Transformanten aufgehoben und mit A bzw. B bezeichnet. Für die Überprüfung der jeweiligen rekombinanten Stämme mittels

Southern-Analyse wurden sowohl upstream- als auch downstream-Sequenzen der Zielgene als Sonden verwendet. In Abbildung 9A ist das Integrationsschema zur Herstellung der GFP-Reporterstämme abgebildet. Beispielhaft dargestellt ist die Integration der Reporter-kassette aus pcdCSP1G2 in den *C. dubliniensis* Wü284 Ausgangsstamm. Ebenfalls in Abbildung 9 sind die Southern-Hybridisierungen zur Überprüfung der Stämme CdCSP1G1 und CaCSP1G1 abgebildet.

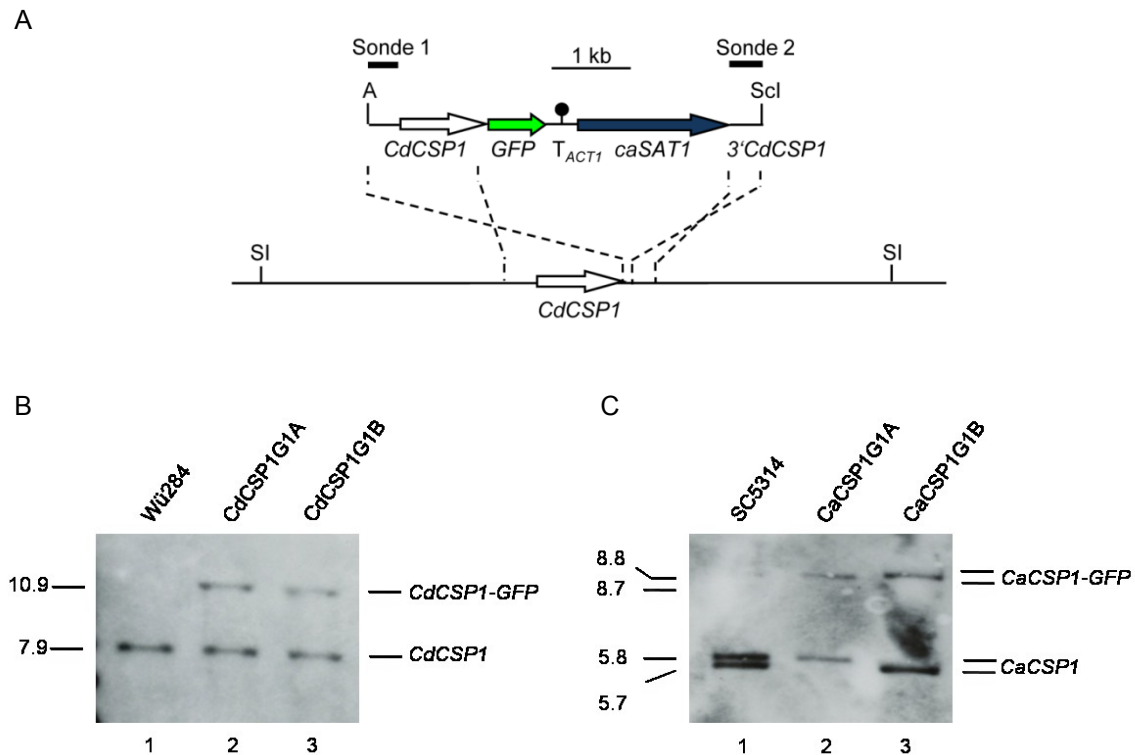


Abb. 9: (A) Integrationsschema zur Herstellung der GFP-Reporterstämme am Beispiel des Gens *CdCSP1*. Die Integration der Kassetten aus pcdCSP2G2, pCSP1G2 und pCSP2G2 erfolgte auf die gleiche Weise. Die kodierende Region von *CdCSP1* ist als weißer Pfeil, up- und downstream-Bereiche als schwarze Linie dargestellt. Das *GFP*-Reportergen ist als grüner, der Selektionsmarker für die *Candida* Transformation-(das *caSAT1*-Gen)-als blauer Pfeil abgebildet. Der schwarze Kreis symbolisiert den *ACT1*-Terminator. Die zur Überprüfung der Transformationen genutzten Sonden für die Southern-Hybridisierung sind als schwarze Balken abgebildet. Relevante Schnittstellen sind eingezeichnet: A, *ApaI*; SI, *SalI*; Scl, *SacI*.

(B/C) Southern-Hybridisierung (B) *SalI* - bzw. (C) *XbaI*-gespaltener genomischer DNA des Ausgangsstammes Wü284 bzw. SC5314 und den angegebenen Transformanten/GFP-Reporterstämmen CdCSP1G1 und CaCSP1G1 mit der jeweiligen Sonde 1. (B) Spur 1: *C. dubliniensis* Wildtyp, Spur 2/3: CdCSP1G1A/B. (C) Spur 1: *C. albicans* Wildtyp, Spur 2/3: CaCSP1G1A/B. Die Größen (in kb) der hybridisierenden Fragmente sind jeweils auf der linken Seite angezeigt, deren Identität rechts.

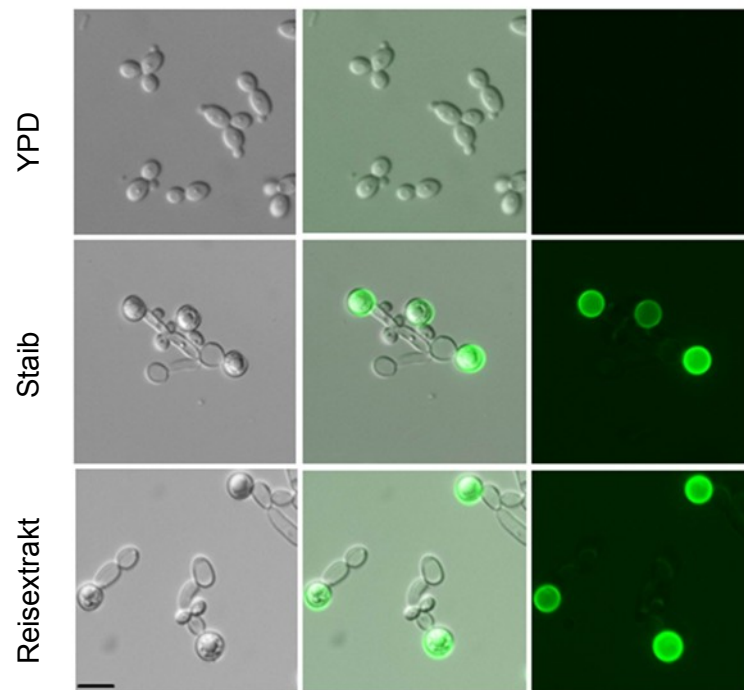
3.3.4 Analyse der GFP-Reporterstämme - Lokalisation von chlamydosporen-spezifischen Markern

Mit der Herstellung der GFP-Reporterstämme war es nun möglich die zelluläre Lokalisation zunächst für die *C. dubliniensis* Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* genauer zu bestimmen. Dafür wurden die Zellen des *C. dubliniensis* Wildtyps und die der resultierenden Reporterstämme *CdCSP1G1A/B* und *CdCSP2G1A/B* für 28 h bei 25°C in Staib-Medium sowie als Kontrolle in YPD-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie in Abbildung 10 eindrucksvoll zu sehen ist, konnten die kodierten Proteine dieser zwei *C. dubliniensis* Gene nicht nur spezifisch in *C. dubliniensis* Zellen während des Wachstums in Staib-Medium gefunden werden, sondern darüber hinaus insbesondere in der Zellwand der Chlamydosporen. Dies konnte jeweils für beide unabhängig konstruierten A/B-GFP-Reporterstämme gezeigt werden. In Abbildung 10 ist jeweils ein Stamm dargestellt.

Die Lokalisation dieser Proteine und die damit verbundene erhöhte Fluoreszenz wurden des Weiteren nicht in Hefezellen oder Pseudohyphen detektiert. Außerdem konnte keine Fluoreszenz in der Suspensorzelle festgestellt werden. Suspensorzellen sind die Zellen, die an ihren terminalen Enden die Chlamydosporen tragen und sich vermutlich mit ihnen eine durchgehende Außenschicht teilen (Jansons und Nickerson, 1970b; Odds, 1988). Daraus ergab sich die Frage, ob diese identifizierten Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* spezifisch nur in den Chlamydosporen von *C. dubliniensis* exprimiert werden, die auf Staib-Agar bzw. in Staib-Medium gebildet werden oder generell in Chlamydosporen des *C. dubliniensis* Wildtyps identifiziert werden können. Dazu wurde mit dem Wachstum der Stämme auf Reisextrakt-Agar eine weitere Bedingung untersucht, in der der *C. dubliniensis* Wildtyp ebenfalls in der Lage ist Chlamydosporen zu entwickeln. Eine deutliche Expression sowie spezifische und exklusive Lokalisation der Proteine in der Wand der Chlamydospore konnte auch unter dieser Bedingung festgestellt werden (Abbildung 10). Damit konnte für die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* zum einen gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Expression und der Chlamydosporenbildung existiert und dass diese Proteine zum anderen spezifisch in der Zellwand von Chlamydosporen lokalisiert sind.

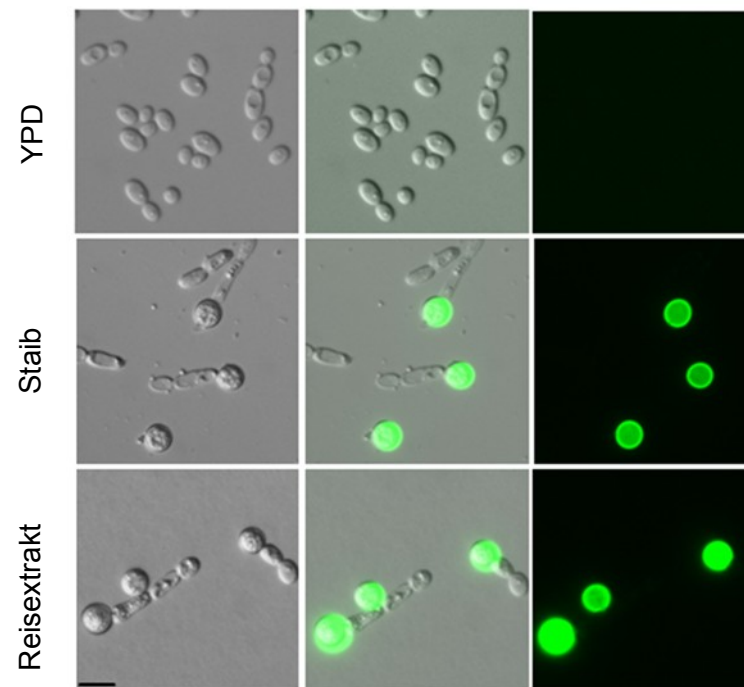
A

CdCSP1-GFP



B

CdCSP2-GFP



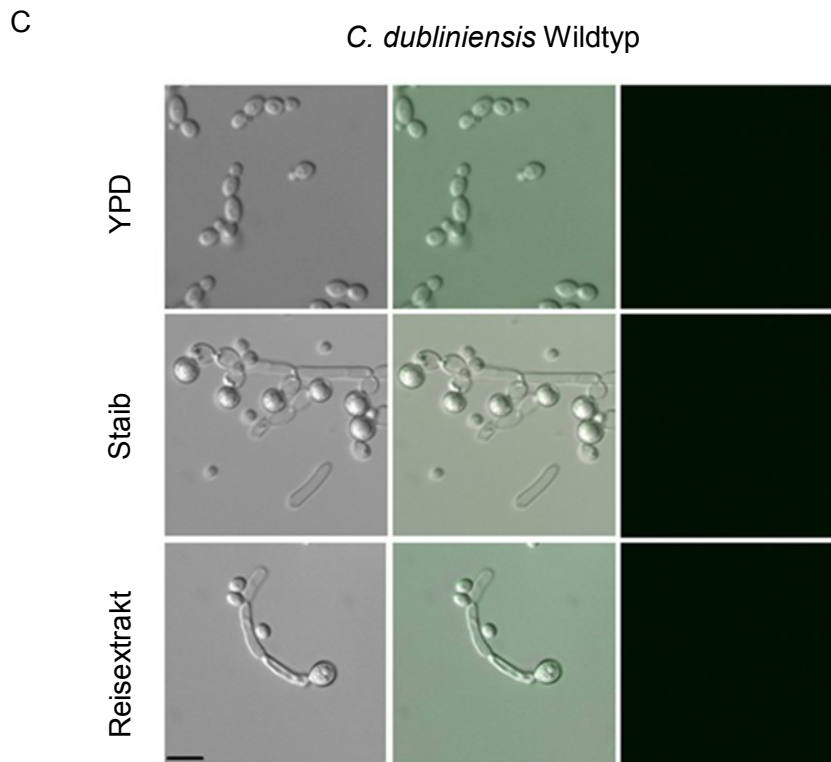


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Reporterstämme CdCSP1G1 (A) und CdCSP2G1 (B) sowie des *C. dubliniensis* Wildtyps Wü284 (C). Die Zellen wurden für 28 h bei 25°C in Staib-Medium bzw. zur Kontrolle in YPD-Medium kultiviert. Auf Reisextrakt-Agar wurden die Stämme 3 d bei 25°C inkubiert. Maßstabsbalken: 10 µm. Links: Durchlicht; mitte: overlay; rechts: Fluoreszenz.

Um zu überprüfen, ob die für *C. dubliniensis* identifizierten chlamydosporenspezifischen Proteine möglicherweise auch in den Chlamydosporen von *C. albicans* spezifisch exprimiert werden, wurden GFP-Reporterstämme für die Homologen *C. albicans* Gene *CaCSP1* und *CaCSP2* hergestellt. Der *C. albicans* Wildtyp SC5314 und die resultierenden Reporterstämme CaCSP1G1A/B und CaCSP2G1A/B wurden für 3 d bei 25°C auf Reisextrakt-Agar kultiviert und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Wie für die Gene in *C. dubliniensis* konnte auch hier gezeigt werden, dass diese Proteine spezifisch während der Chlamydosporenbildung exprimiert werden und ebenfalls exklusiv in Chlamydosporen lokalisiert sind (Abbildung. 11). Dieser Phänotyp konnte mit beiden unabhängig konstruierten A/B-GFP-Reporterstämmen gezeigt werden, jedoch ist nur jeweils ein Stamm dargestellt (Abbildung. 11).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Produkte der Gene *CdCSP1/CaCSP1* und *CdCSP2/CaCSP2* spezifisch für Chlamydosporen sind. Darüber hinaus konnten damit erstmals Gene identifiziert werden, die spezifisch in der Zellwand von Chlamydosporen lokalisiert sind und somit als Marker genutzt werden können.

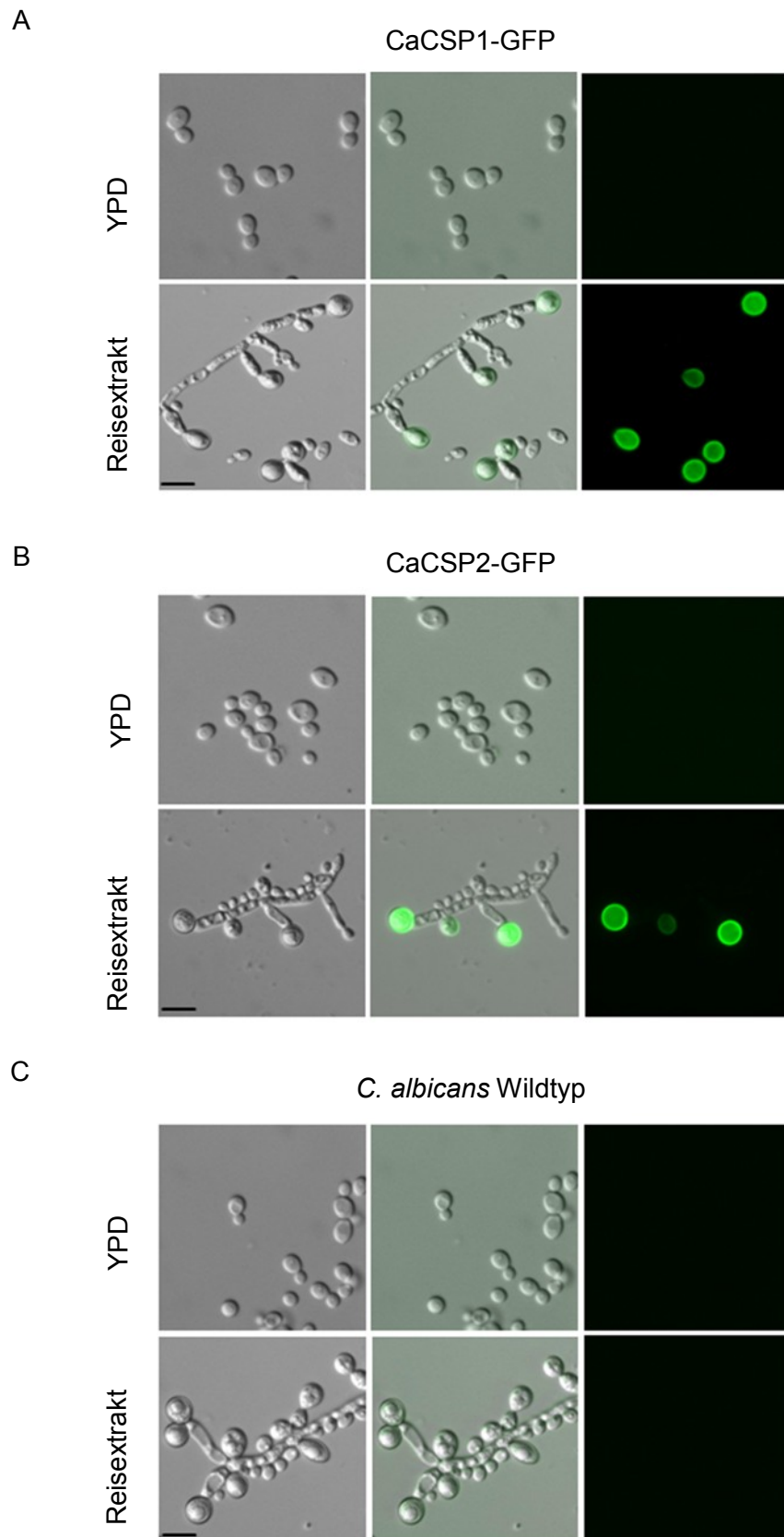


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Reporterstämme CaCSP1G1 (A) und CaCSP2G1 (B) sowie des *C. albicans* Wildtyps SC5314 (C). Die Zellen wurden auf Reisextrakt-Agar 3 d bei 25°C inkubiert. Wachstum in YPD-Medium diente der Kontrolle. Maßstabsbalken: 10 µm. Links: Durchlicht; mitte: overlay; rechts: Fluoreszenz.

3.4 Konstruktion von *C. dubliniensis*-Deletionsmutanten in den Genen *CdCSP1* und *CdCSP2*

Wenngleich die Funktion von Chlamydosporen bislang unbekannt ist, wurden dennoch in einem nächsten Schritt Deletionsmutanten der *C. dubliniensis* Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* hergestellt. Da diese Gene zuvor als chlamydosporenspezifische Marker identifiziert werden konnten, sollte nun mit Hilfe der Deletionsmutanten überprüft werden, ob die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* auch bei der Bildung von Chlamydosporen eine Rolle spielen. Des Weiteren wurde eine Reihe von Untersuchungen zum Wachstum der Deletionsmutanten unter zellwandstressinduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dies beruht darauf, dass in älteren Publikationen die Frage aufkam, ob Chlamydosporen Stress-resistente Dauerformen wären, was jedoch nicht bestätigt werden konnte (Jansons und Nickerson, 1970a/b; Odds, 1988). Trotzdem sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob die hergestellten Mutanten unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen sensibler gegen Zellwandstress sind.

Die Deletionsmutanten der *C. dubliniensis* Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* wurden dazu mit Hilfe der SAT1-Flipper Technik hergestellt (Reuss *et al.*, 2004). Zunächst wurden dafür Plasmide hergestellt, die spezifische Deletionskassetten für die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* enthielten. Durch Transformation des *C. dubliniensis* Wü284 mit diesen Konstrukten und anschließendem Recycling des Selektionsmarkers war es möglich die entsprechenden Gene zu deletieren. Im Folgenden ist die Konstruktion der Plasmide und rekombinaten *C. dubliniensis*-Stämme beschrieben.

3.4.1 Konstruktion der Deletionskassetten für die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2*

Alle in dieser Arbeit hergestellten Deletionskassetten sind vom Plasmid pSSU1M2 abgeleitet, welches den SAT1-Flipper enthält. Für die Herstellung der Deletionskonstrukte wurden die entsprechenden homologen Bereiche zur spezifischen Integration ausgetauscht. Dafür wurden die upstream-Bereiche der Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* mit den Primer-Paaren CD36_30750-1/CD36_30750-2 und CD36_40770-1/CD36_40770-2 und genomischer DNA des *C. dubliniensis* Wildtyp-Stammes Wü284 als Template per PCR amplifiziert und als *ApaI/XhoI*-Fragmente in das *ApaI/XhoI*-gespaltene Plasmid pSSU1M2 kloniert. In die daraus resultierenden Plasmide pcdCSP1M1 und pcdCSP2M1 wurden die jeweiligen downstream-Bereiche kloniert.

Tabelle 10: Verwendete Templates, Primer, eingefügte Schnittstellen und Konstruktionsweisen der Deletionskassetten für die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* und deren Vorstufen. Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Gens. (A von ATG = +1)

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_30750-1 CD36_30750-2	<i>ApaI</i> -site bei -385 <i>XhoI</i> -site bei +11	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcdCSP1M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_30750-3 CD36_30750-4	<i>SacII</i> -site bei +1096 <i>SacI</i> -site bei +1516	<i>SacII/SacI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacII/SacI</i> -gespaltenes pcdCSP1M1	pcdCSP1M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_40770-1 CD36_40770-2	<i>ApaI</i> -site bei -448 <i>XhoI</i> -site bei +10	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcdCSP2M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_40770-3 CD36_40770-4	<i>SacII</i> -site bei +758 <i>SacI</i> -site bei +1141	<i>SacII/SacI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacII/SacI</i> -gespaltenes pcdCSP1M1	pcdCSP2M2

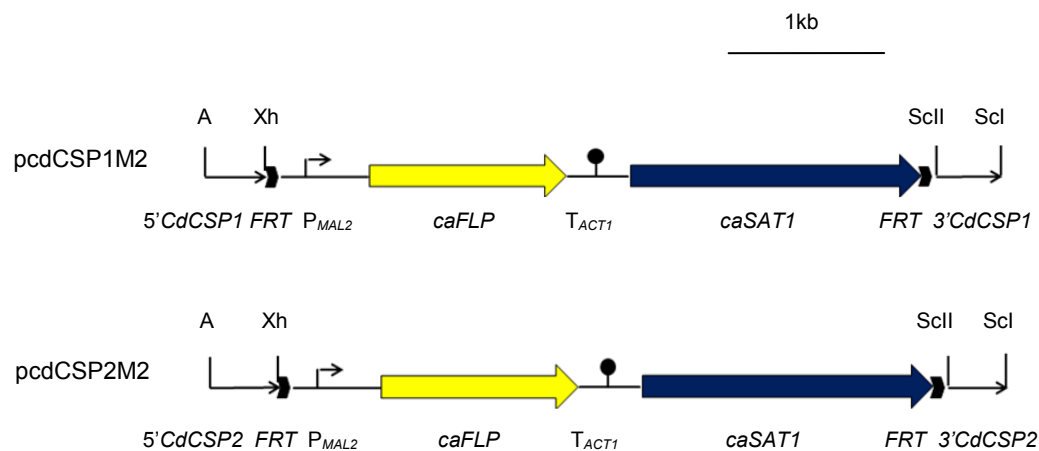


Abb. 12: DNA-Kassetten zur Deletion der Gene *CdCSP1* und *CdCSP2*. Die linearen Transformationsfragmente können als *ApaI/SacI*-Fragmente aus den abgebildeten Plasmiden herausgespalten werden. Alle Kassetten enthalten den *SAT1*-Flipper, bestehend aus dem *caSAT1*-Gen als dominanten Selektionsmarker (blauer Pfeil), dem *caFLP*-Gen (gelber Pfeil) unter Kontrolle des induzierbaren *MAL2*-Promotors (abgewinkelter Pfeil) vor dem *ACT1*-Transkriptionsterminator (Kreis) und den flankierenden Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase, den *FRT*-sites (schwarze Pfeile; nicht im Maßstab dargestellt). Der Flipper ist stets von spezifischen 5'- und 3'-Bereichen des Zielgens flankiert und ermöglicht so die ortsspezifische Integration durch homologe Rekombination. Für die Klonierung relevante Schnittstellen sind angegeben: A, *ApaI*; Scl, *SacI*; ScII, *SacII*; Xh, *XhoI*.

Für die Amplifizierung der downstream-Bereiche wurden die Primer-Paare CD36_30750-3/CD36_30750-4 und CD36_40770-3/CD36_40770-4 verwendet. Die entstandenen PCR-Produkte wurden als *SacI*/*SacII*-Fragmente in die *SacI*/*SacII*-gespaltenen Vorgängerplasmide ligiert. Dabei wurden schließlich die Plasmide pcdCSP1M2 und pcdCSP2M2 gewonnen, die die fertigen Deletionskassetten enthielten (Abbildung 12). Tabelle 10 zeigt die verwendeten Templates, Primer, eingefügten Schnittstellen und die Konstruktionsweise der Deletionskassetten.

3.4.2 Konstruktion der *C. dubliniensis*-Einzelmutanten in den Genen *CdCSP1* bzw. *CdCSP2*

Für die Herstellung der *C. dubliniensis*-Mutanten in chlamydosporenspezifischen Genen wurde der Ausgangsstamm Wü284 verwendet. Dieser wurde mit den linearen *ApaI*/*SacI*-Fragmenten aus den Plasmiden pcdCSP1M2 und pcdCSP2M2 transformiert. Wie bereits im Material und Methoden Teil beschrieben, wurden Nourseothricin-resistente *C. dubliniensis* Transformanten auf YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin selektiert. Die dabei erhaltenen heterozygoten Stämme CdCSP1M1 und CdCSP2M1 wurden mittels Southern-Analyse bezüglich der korrekten Integration der jeweiligen Deletionskassette überprüft. Um über eine Induktion des *MAL2*-Promotors die FLP-vermittelte Exzision des *SAT1*-Flippers auszulösen, wurden die Mutanten in YPM-Medium kultiviert. Das Screening auf Nourseothricin-sensitive Derivate erfolgte zunächst auf YPD-Platten (2 d; 30°C).

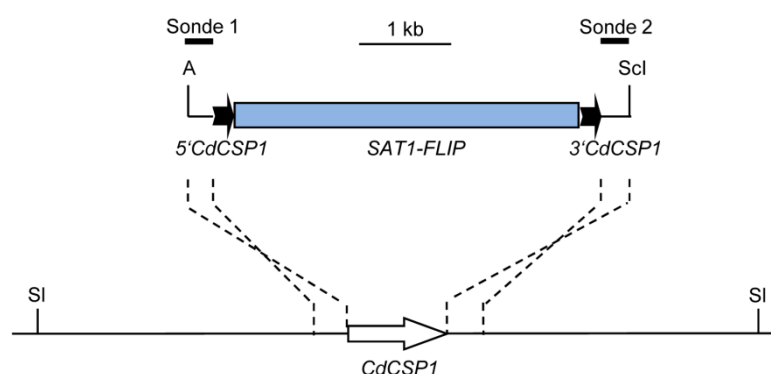


Abb. 13: Konstruktion der *C. dubliniensis*-Deletionsmutante in *CdCSP1*. Deletion des Gens *CdCSP2* wurde nach demselben Schema durchgeführt. Ebenfalls gezeigt ist die Struktur des wildtypischen Genlokus im Stamm Wü284. Die kodierende Region des Gens *CdCSP1* ist als weißer Pfeil dargestellt, der *SAT1*-Flipper mit den flankierenden *FRT*-sites (schwarze Pfeile, nicht im Maßstab gezeichnet) als blauer Balken. Die zur Überprüfung genutzten Sonden für die Southern-Hybridisierung sind als schwarze Balken abgebildet. Relevante Schnittstellen sind eingezeichnet: A, *ApaI*; Scl, *SacI*; SI, *SalI*.

Die dort gewachsenen Transformanten wurden parallel auf YPD-Platten und YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin weiterkultiviert (2 d, 30°C). Nourseothricin-sensitive Stämme konnten schließlich nur auf den YPD-Platten wachsen, nicht aber auf YPD-Platten mit 100 µg/ml Nourseothricin. Darüber hinaus wurde die Exzision der Flipperkassette ebenfalls mit Hilfe der Southern-Hybridisierung überprüft. Die erhaltenen Nourseothricin-sensitiven Stämme wurden mit CdCSP1M2 und CdCSP2M2 bezeichnet. Für die Deletion des zweiten Allels des Zielgens unter Wiederverwendung der Flipper-Kassette, wurde in gleicher Weise vorgegangen. Die dabei entstandenen homozygoten Mutanten wurden CdCSP1M3 und CdCSP2M3 (Deletionskassette im verbliebenen, intakten Allel inseriert) bzw. CdCSP1M4 und CdCSP2M4 (nach Exzision des *SAT1*-Flippers) genannt. Alle Mutagenesen wurden unabhängig je zweimal durchgeführt und die entsprechenden Transformanten mit A bzw. B bezeichnet. Für die Überprüfung der jeweiligen Mutanten mittels Southern-Analyse wurden sowohl upstream- als auch downstream-Sequenzen der Zielgene als Sonden verwendet.

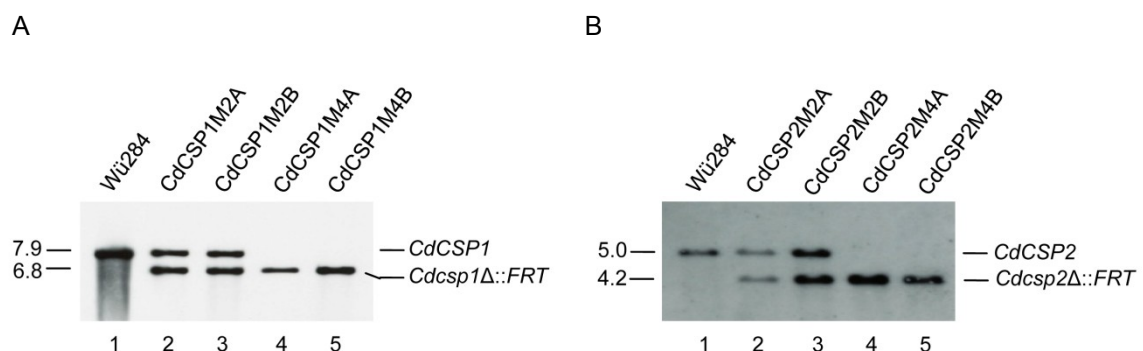


Abb. 14: Southern-Hybridisierung (A) *SalI*- bzw. (B) *EcoRV*-gespaltener genomischer DNA des Ausgangsstammes Wü284 und den angegebenen Mutanten mit der jeweiligen Sonde1. (A) Spur 1: *C. dubliniensis* Wildtyp, Spur 2/3: heterozygote Mutanten CdCSP1M2A/B, Spur4/5: homozygote Mutanten CdCSP1M4A/B. (B) Spur 1: *C. dubliniensis* Wildtyp, Spur 2/3: heterozygote Mutanten CdCSP2M2A/B, Spur4/5: heterozygote Mutanten CdCSP2M4A/B. Die Größen (in kb) der hybridisierenden Fragmente sind jeweils auf der linken Seite angezeigt, deren Identität rechts.

3.5 Phänotypische Analyse der *C. dubliniensis*-Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4

3.5.1 Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen

Nach der Herstellung der Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4 für die *C. dubliniensis* Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* wurden diese zuerst auf ihr Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen überprüft. Dafür wurden die Zellen der zu untersuchenden Stämme zum einen für 28 h bei 25°C in Staib-Medium, zum anderen für 3 d bei 25°C auf Reisextrakt-Platten kultiviert. Eine veränderte Fähigkeit zur Bildung von Chlamydosporen konnte in den Deletionsmutanten jedoch nicht gefunden werden. In beiden Medien wuchsen die Mutanten genauso wie der Wildtyp Wü284. Die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* sind also spezifisch für Chlamydosporen, allerdings nicht essentiell für deren Ausbildung. In Abbildung 15 ist das Wachstum des *C. dubliniensis* Wildtyps sowie der Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4 in Staib-Medium dargestellt.

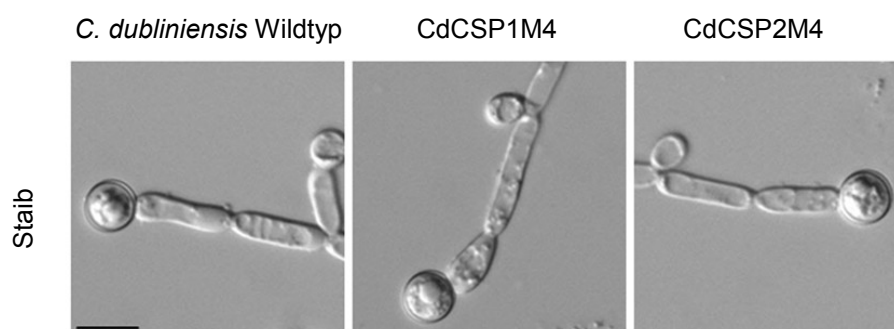


Abb. 15: Mikroskopische Aufnahme des *C. dubliniensis* Wildtyps Wü284 und der Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4 nach 28-stündigem Wachstum in Staib-Medium bei 25°C. Maßstabsbalken: 10 µm.

3.5.2 Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen

Neben der Überprüfung der Fähigkeit der Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4 Chlamydosporen zu bilden, wurden die Mutanten in einer weiteren Untersuchung hinsichtlich ihres filamentösen Wachstums getestet. Da mittels einer pH-induzierten Filamentierung auch *C. dubliniensis* innerhalb weniger Stunden in der Lage ist Keimschläuche zu bilden, wurden die zu untersuchenden Stämme über Nacht in flüssigem M199-Medium (pH 4) bei 30°C kultiviert, anschließend in M199-Medium mit pH 8

überimpft und bei 37°C für 1-6 h geschüttelt. Für die Deletionsmutanten konnte dabei kein Unterschied im Vergleich zum *C. dubliniensis* Wildtyp festgestellt werden. Bereits nach 4-stündigem Wachstum der Stämme in M199-Medium (pH 8) bildete sowohl der wildtypische Stamm Wü284, als auch die *Cdcsp1/2Δ*-Mutanten Keimschläuche aus (nicht gezeigt).

3.5.3 Wachstum unter zellwandstressinduzierenden Bedingungen

Nachdem die Deletion einzelner chlamydosporenspezifischer Gene keinerlei Auswirkung auf die Ausbildung dieser morphologischen Strukturen hatte, wurden im Folgenden weitere phänotypische Analysen mit den Stämmen CdCSP1M4 und CdCSP2M4 durchgeführt. Wie bereits erwähnt, sollten die hergestellten Mutanten hinsichtlich ihres Wachstums unter verschiedenen zellwandstressinduzierenden Bedingungen untersucht werden. Durch die exklusive Expression dieser Gene in Chlamydosporen lag die Vermutung nahe, dass durch die Kombination von Gendeletion und dem Zusatz von Zellwandstressoren eine normale Entwicklung von Chlamydosporen verzögert oder gestört ist. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die generelle Wachstumsfähigkeit der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp herabgesetzt sein könnte. Ab einer bestimmten Konzentration verursacht jede dieser Substanzen eine Störung im Aufbau der Zellwand, wodurch der Pilz nicht mehr in der Lage ist zu wachsen. Mittels Plattentropftest wurde die Wachstumsfähigkeit und die Chlamydosporenentwicklung der Deletionsmutanten im Vergleich zum *C. dubliniensis* Wildtyp bezüglich unterschiedlicher Zellwandstressoren untersucht. Dafür wurden Festmedien verwendet, die mit verschiedenen Zusätzen supplementiert wurden. Die Platten wurden jeweils bei 30°C für 2 d inkubiert. In Tabelle 11 sind die ausgewählten Medien und deren Zusätze sowie die jeweils getesteten Konzentrationen aufgelistet.

Bei der Auswahl der zu testenden Agenzien wurde auf ein vielfältiges Wirkungsspektrum geachtet. So ist Fluconazol als Antimykotikum bekannt, welches in der therapeutischen Praxis eine weitverbreitete Anwendung findet. Es hemmt die Biosynthese des Ergosterols, genauer die P450-abhängige Demethylierung von Lanosterol zu Ergosterol in der Pilzzelle. Durch die Inhibition der Demethylase kommt es in der Zellmembran zu einem Ergosterolmangel bei gleichzeitiger Akkumulation von anormalen Sterolen. Diese Veränderung in der Lipidzusammensetzung führt zu einer Änderung der Membranpermeabilität und schließlich zum Funktionsverlust der Plasmamembran

(Mysiakina *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 1985). Calcofluor White (CW) und Kongorot gelten als Zellwand-destabilisierenden Agenzien. CW zum Beispiel bindet an chitinhaltige Strukturen und kann in hohen Konzentrationen (500 µg/ml) deren Ausbildung stören (Elorza *et al.*, 1983).

Tabelle 11: Verwendete Medien und Zusätze der Plattentropftests.

Substanz/Konzentration	Medium
<u>Calcofluor White (CW)</u> 25; 50; 100; 250; 500 µg/ml 1; 5; 7,5; 10 µg/ml	YPD-, Staib-Agarplatten SD-Agarplatten
<u>Congo red/Kongorot</u> 250; 500; 750 µg/ml	YPD-, Staib-Agarplatten
<u>Fluconazol</u> 0,25; 0,5; 1; 2,5 µg/ml	YPD-, Staib-Agarplatten
<u>Menadion</u> 5; 10; 25; 50; 75 µM	YPD-, Staib-Agarplatten
<u>Wasserstoffperoxid (H₂O₂)</u> 1; 2; 4 mM 0,5; 0,75; 1,25 mM	YPD-, Staib-Agarplatten SD-Agarplatten

Darüber hinaus wurden mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Menadion auch die Auswirkung von oxidativem Stress auf die Deletionsmutanten untersucht. Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden nicht nur Nukleinsäuren (Doppelstrangbrüche) geschädigt, sondern auch Lipide (Bildung von Lipidperoxiden) und Proteine (Oxidation von Aminosäureseitenketten) (Fridovich, 1978; Osorio *et al.*, 2003).

Wie sich durch die Tropftests zeigte, sind die untersuchten Stämme in ihrem Wachstum nahezu identisch. Durch Supplementation mit den verschiedenen Zellwandstressoren konnten zwischen dem *C. dubliniensis* Wildtyp und den Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4 keine Unterschiede in der Wachstumsfähigkeit beobachtet werden. Trotz der vielfältigen Angriffspunkte der getesteten Substanzen konnte keine die Wachstumsfähigkeit der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp herabsetzen. In Abbildung 16 ist beispielhaft das Ergebnis des Tropftestes für die Substanz Calcofluor White in SD-Medium dargestellt. Wie unter 3.5.1 bereits beschrieben und in Abbildung 15 gezeigt, konnten für die Deletionsmutanten in den Genen *CdCSP1* und *CdCSP2* keine Veränderungen in der Ausbildung von Chlamydosporen im Vergleich zum Wildtyp Wü284 gefunden werden. Durch Supplementation der Staib-Agarplatten mit den aufgeführten Zellwandstressoren wurde ebenfalls keinerlei Unterschied in der

Chlamydosporenentwicklung beobachtet. Es konnte dabei keine zeitliche Verzögerung durch den zusätzlichen Zellwandstress und auch keine makroskopischen bzw. mikroskopischen Veränderungen der Chlamydospore selbst festgestellt werden. Zukünftig könnte dies aber genauer mit Hilfe von Elektronenmikroskopie überprüft werden. Bereits minimale Veränderungen in der Zellwand, in deren Durchmesser und Struktur könnten dabei mit einer elektronenmikroskopischen Analyse detektiert werden.

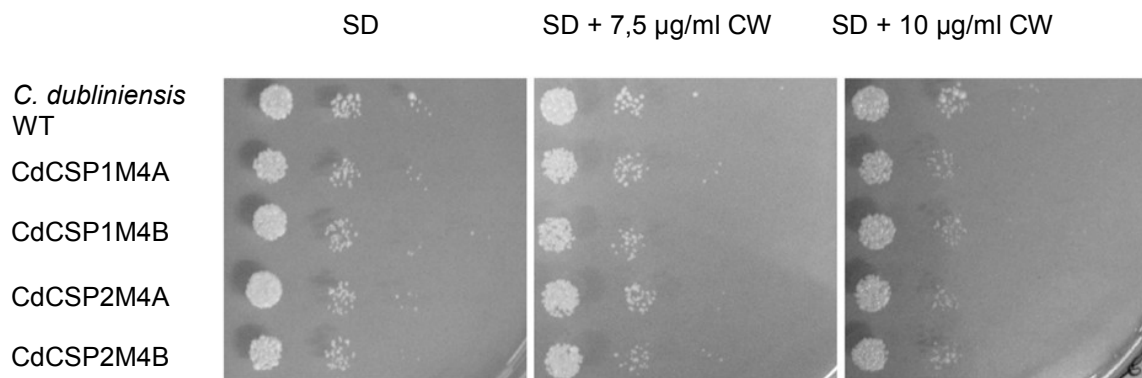


Abb. 16: Plattentropftest zur phänotypischen Analyse der Deletionsmutanten CdCSP1M4 und CdCSP2M4. SD-Agar wurde mit 7,5- und 10 µg/ml Calcofluor White supplementiert und die Platten 2 d bei 30°C kultiviert; (Wildtyp = WT).

3.6 Anwendung der GFP-Reporterstämme

Bei der Auswertung der RNA-Sequenzierung unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen sind neben den zahlreichen putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen auch solche Gene aufgefallen, die bei *C. albicans* mit Mating bzw. Switching in Verbindung gebracht wurden. Beispielsweise *DAG7* und *orf19.2317*, deren Expression durch (α)Alpha-Pheromon induziert wird (Dignard und Whiteway, 2006). Als ein opaque-spezifisches Gen ist *orf19.2506* erwähnt (Tsong *et al.*, 2003). Da die biologische Funktion von Chlamydosporen bis heute nicht geklärt ist und auch eine Verbindung dieser morphologischen Strukturen und dem Mating möglich ist, wurden erste Untersuchungen in dieser Arbeit vorgenommen.

3.6.1 Chlamydosporeninduktion in Mating-kompetenten Stämmen

Zunächst wurde überprüft, ob Stämme, die durch genetische Manipulation in ihren *MTL*-Loki homozygot für *MATa* oder *MAT α* sind, auch Chlamydosporen ausbilden. Dafür wurden freundlicherweise von Prof. Joachim Morschhäuser (Institut für Molekulare

Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Deutschland) zwei *C. albicans*-Stämme zur Verfügung gestellt, für die das der Fall ist. Sie sind in ihrem *MTL*-Lokus homozygot einmal für α -Zellen (SCMTLaM2) und einmal für α -Zellen (SCMTLaM2). Nach 3-tägiger Inkubation dieser Stämme auf Reisextrakt-Agar konnte eine Ausbildung von Chlamydosporen, genau wie im *C. albicans* Wildtyp, beobachtet werden (Abbildung 17).

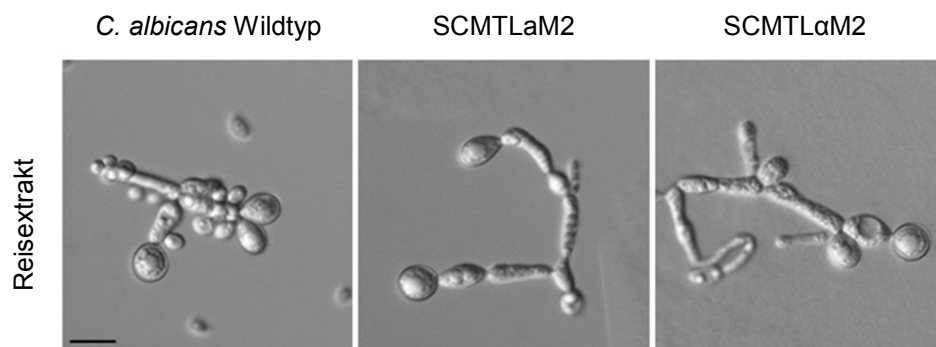


Abb. 17: Chlamydosporenentwicklung in den Stämmen SCMTLaM2 und SCMTLaM2 im Vergleich zum *C. albicans* Wildtyp. Die Stämme wurden auf Reisextrakt-Agar ausgestrichen, teilweise mit einem Deckgläschen bedeckt und für 3 d bei 25°C kultiviert. Maßstabsbalken: 10 μ m.

3.6.2 Herstellung von GFP-Reporterstämmen für das Gen *CaCSP1* in Mating-kompetenten *C. albicans*-Stämmen

Die spezifische Lokalisierung der Produkte der Gene *CdCSP1/CaCSP1* und *CdCSP2/CaCSP2* in der Zellwand von Chlamydosporen sowie die Beobachtung, dass auch Switching- bzw. Mating-spezifische Gene bei der Chlamydosporenbildung differentiell reguliert werden, warf die Frage auf, ob eine ähnliche Aktivierung von *CaCSP1* in Mating-kompetenten *C. albicans*-Stämmen stattfindet. Um das erstmals zu testen, wurden die Stämme SCMTLaM2 und SCMTLaM2 mit der unter 3.3.1 hergestellten Reporter-kassette bzw. mit den linearen *ApaI/SacI*-Fragmenten aus dem Plasmid pCSP1G2 nach derselben Vorgehensweise wie unter 3.3.2 beschrieben, transformiert. Die entstandenen Stämme wurden als SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 bezeichnet. Nach Inkubation der Stämme unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen (Reisextrakt-Agar; 3 d; 25°C) wurden diese mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei zeigten die hergestellten GFP-Reporterstämme SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 eine erhöhte Fluoreszenz in der Zellwand der Chlamydosporen (Abbildung 18).

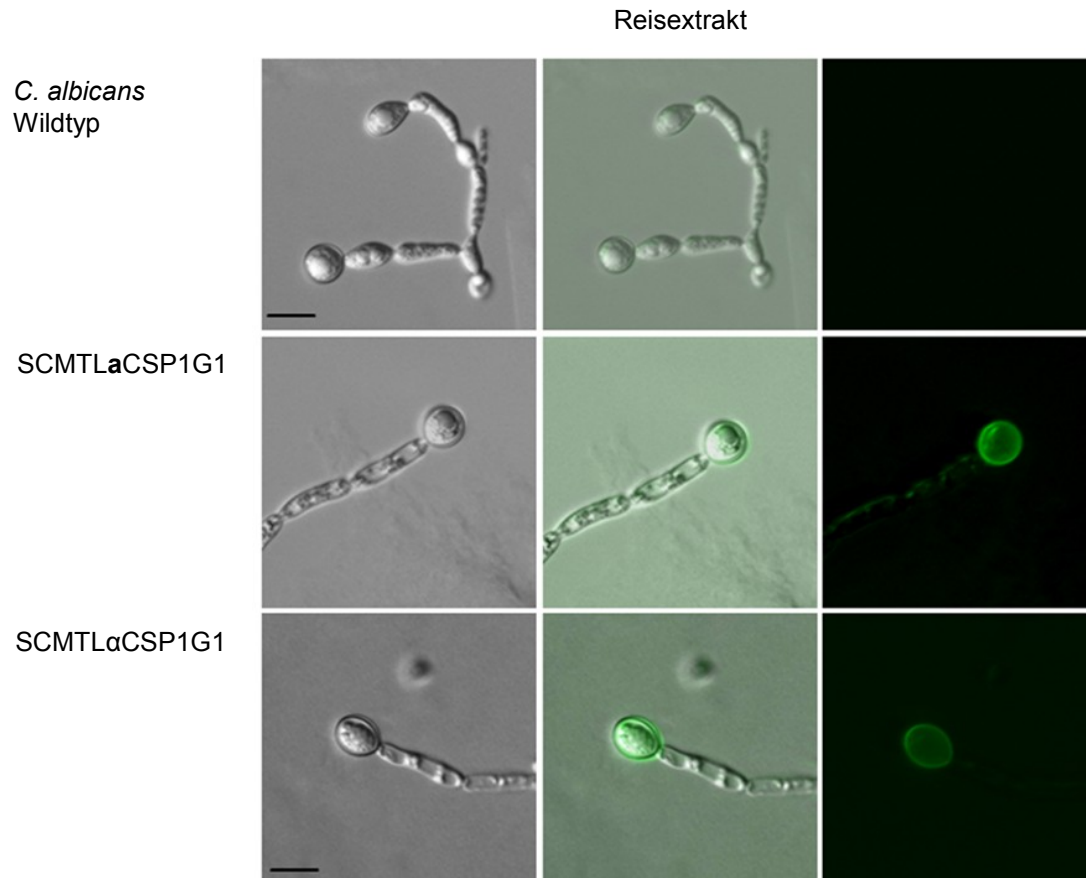


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie der GFP-Reporterstämme SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 sowie des *C. albicans* Wildtyps SC5314. Die Zellen wurden auf Reisextrakt-Agar 3 d bei 25°C inkubiert. Maßstabsbalken: 10 µm.

Somit konnte bestätigt werden, dass das analysierte Gen auch in Mating-kompetenten α - bzw. α -Stämmen während der Chlamydosporenbildung exprimiert wird, sowie auch im α/α -Kontrollstamm SC5314. Ferner kann nun mit diesen Reporterstämmen beispielsweise untersucht werden, ob das „chlamydosporenspezifische“ Gen *CaCSP1* möglicherweise während des Matings dieser Stämme exprimiert wird.

3.6.3 Untersuchungen zum Wachstum von SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 in Gegenwart von α -Pheromon

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob das hier untersuchte „chlamydosporenspezifische“ Gen *CaCSP1* auch mittels α -Pheromon-Zugabe, unter nicht chlamydosporenspezifischen Bedingungen, induziert werden kann. Dafür wurden die GFP-Reporterstämme SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 in YPD-Medium mit 1 µg/ml α -Pheromon bei 25°C für 28 h inkubiert. Als Kontrollen wurden der *C. albicans* und

C. dubliniensis Wildtyp ebenfalls untersucht. Dabei konnte allerdings weder für die Kontrollstämme noch für die Stämme SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 ein Wachstum von Chlamydosporen beobachtet werden. Alle Zellen wuchsen in ihrer Hefeform. Viel wichtiger dabei ist zu erwähnen, dass keinerlei GFP-Signal bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung detektiert werden konnte, d. h. α -Pheromon allein führt nicht zu einer Induktion des untersuchten Gens.

3.7 Untersuchungen zur Chlamydosporenbildung in *C. albicans* und *C. dubliniensis* mittels DNA-Microarrayanalyse

Neben der RNA-Sequenzierung wurde alternativ auch mittels DNA-Microarray ein globales Transkriptionsprofil der Wildtypen *C. albicans* und *C. dubliniensis* sowie der *C. albicans* *nrg1* Δ -Mutante unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen erstellt. Dafür wurden die *C. dubliniensis*-Microarrays in Auftragsarbeit von der Firma „febit biomed GmbH“ (jetzt: CBC Comprehensive Biomarker Center GmbH) (Heidelberg) durchgeführt und ausgewertet. Die *C. albicans*-Microarrays wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernhard Hube (HKI; Abteilung MPM: Mikrobiologische Pathogenitätsmechanismen) mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Ronny Martin (ehemals HKI; Abteilung MPM: Mikrobiologische Pathogenitätsmechanismen) durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden von Dr. Jörg Linde (HKI; Abteilung: Systembiologie/Bioinformatik) ausgewertet. Zusätzlich wurden auch die Ergebnisse der *C. dubliniensis*-Microarrays der Firma „febit“ von Dr. Jörg Linde ausgewertet und sofern es möglich war, mit den *C. albicans*-Microarrays verglichen, um zum einen ebenfalls Gene zu identifizieren, die möglicherweise chlamydosporenspezifisch sein könnten und zum anderen eine einheitliche Auswertung zu erzielen.

Für die Microarrays wurde RNA des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314, des *C. dubliniensis* Wildtypstammes Wü284 und des *C. albicans* MMC3 (*nrg1* Δ) nach 28-stündiger Inkubation in Staib-Medium und in YPD-Medium (25°C) isoliert. Dies geschah jeweils in Triplikaten. In Abbildung 3 unter 3.1.1 ist die Morphologie der Stämme in beiden Medien nach 28 h abgebildet. Wie bereits erwähnt, wurde die zusätzliche Inkubation der Stämme in YPD-Medium verwendet, um bei der Auswertung hyphenspezifische (*C. albicans* *nrg1* Δ -Mutante bildet Pseudohyphen in YPD-Medium) und mediumsspezifische Gene auszuschließen. Somit können die möglichen

chlamydosporenspezifischen Gene eingegrenzt werden. Die Transkriptionshäufigkeit ausgewählter Gene wurde ferner durch quantitative Real-Time-PCR genauer ermittelt.

3.7.1 Differentiell regulierte Gene in Staib-Medium vs. YPD-Medium

Bei der Auswertung des Transkriptionsmusters der drei zu untersuchenden Stämme während des Wachstums in Staib-Medium verglichen mit dem Wachstum in YPD-Medium wurden in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante 543 Gene und im *C. dubliniensis* Wildtyp 494 Gene ≥ 2 -fach herauf reguliert (Fold Change [FC] ≥ 2). Dabei wurden 84 Gene in beiden Stämmen differentiell herauf reguliert (Abbildung 19A). Des Weiteren wurden 563 Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp und 684 Gene in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante identifiziert die ≥ 2 -fach herab reguliert waren. Darunter waren 89 Gene in beiden Stämmen differentiell herab reguliert (Abbildung 19B).

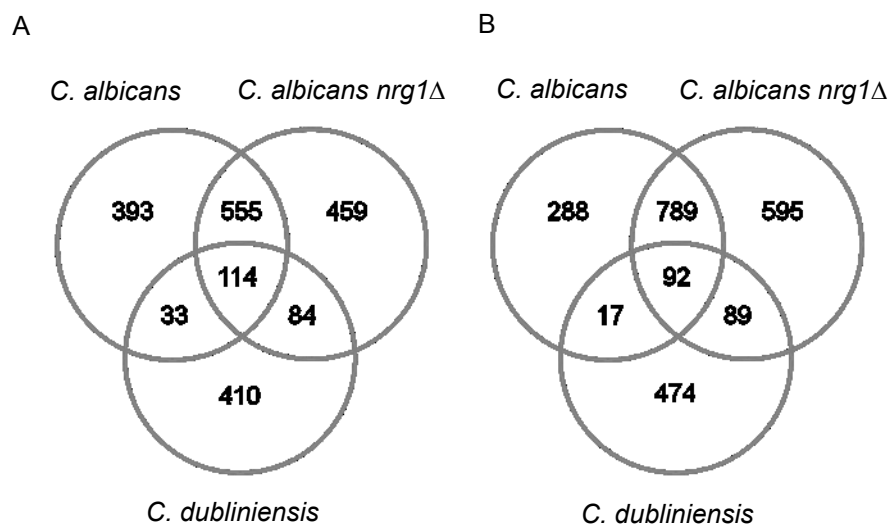


Abb. 19: Venn-Diagramm der ≥ 2 -fach herauf (A) und herab (B) regulierten Gene im *C. albicans* Wildtyp, im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante (Fold Change ≥ 2) in Staib-Medium vs. YPD-Medium.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit waren besonders die 84 herauf regulierten Gene in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und im *C. dubliniensis* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium verglichen mit dem Wachstum in YPD-Medium von Interesse, da beide Stämme in Staib-Medium Chlamydosporen entwickeln können. Im Folgenden sind einige dieser 84 herauf regulierten Gene näher beschrieben. Zudem sind diese 84 Gene und deren Regulation während des Wachstums in Staib-Medium vs. YPD-Medium in einer Tabelle im Anhang aufgelistet.

Wie auch bei der RNA-Sequenzierung konnten unter den 84 differentiell herauf regulierten Genen in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und im *C. dubliniensis* Wildtyp eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die für uncharakterisierte/hypothetische Proteine kodieren oder deren Funktion noch unbekannt ist. Des Weiteren gab es einige Gene die sowohl mittels RNA-Seq als auch mit Hilfe des DNA-Microarrays identifiziert wurden, d. h. in beiden Transkriptionsprofilen zu finden waren. Es handelt sich dabei um die Gene *PGA55* (*orf19.207/CD36_23160*), *orf19.2506/CD36_80940*, *orf19.3885/CD36_31810*, *orf19.6741/CD36_87380*, *CaCSP2/CdCSP2* (*orf19.4170/CD36_40770*), *POX18* (*orf19.3330.3/CD36_01320*), *orf19.2317/CD36_10300* und *orf19.2457/CD36_05580*. Auffällig war, dass das Transkriptionsprofil nicht von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen dominiert wurde, wie es bei der RNA-Seq der Fall war. Das Gen *CaCSP2/CdCSP2* konnte jedoch ebenfalls Hilfe der DNA-Microarrays unter den 84 differentiell herauf regulierten Genen in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und im *C. dubliniensis* Wildtyp identifiziert werden. Weiterhin fielen bei der Auswertung u. a. die Gene *MAL31*, *orf19.3982* und *orf19.7437* auf, die alle im Zusammenhang mit dem Maltosestoffwechsel genannt werden. *MAL31* kodiert in *C. albicans* für einen putativen Maltosetransporter und wird unter alkalischen Bedingungen herauf reguliert (Bensen *et al.*, 2004). Sein Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_54530* kodiert ebenfalls für einen putativen Maltosetransporter, ist aber auch als mutmaßlicher Maltotriosetransporter oder als Maltosepermease angegeben. *Orf19.7437* ist in *C. albicans* als uncharakterisiertes Protein beschrieben, das Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_86460* als putative Maltoseacetyltransferase. *Orf19.3982* kodiert für eine Maltase und wird während des Wachstums auf Saccharose induziert (Williamson *et al.*, 1993). Das entsprechende Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_54540* ist ebenfalls als putative Maltase beschrieben. Darüber hinaus ist für *orf19.3982* bekannt, dass dessen Transkription durch α -Pheromon und in Biofilmen induziert wird (Bonhomme *et al.*, 2011).

Unter den 84 herauf regulierten Genen fielen weiterhin, wie auch bei der RNA-Sequenzierung, einige Gene auf, die zuvor in Verbindung mit „Mating“ oder „Switching“ in *C. albicans* gebracht wurden. Dazu gehören beispielsweise *EHT1* und *UBC8*, deren Expression ebenfalls durch α -Pheromon induziert wird (Bennett und Johnson 2006). Zudem kodiert *EHT1* für ein Protein, welches dem *S. cerevisiae* Eht1 ähnlich ist und in *C. dubliniensis* (*CD36_03190*) als putative Alkoholacyltransferase beschrieben ist (Bennett und Johnson 2006). *UBC8* ist dem *S. cerevisiae* Ubc8 ähnlich und das Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_01670* wird als mutmaßliche Ubiquitinligase bzw.

Ubiquitincarrierprotein beschrieben. Im Hinblick auf das white-opaque-Switching kann das Gen *FAA2* genannt werden. Dessen Expression wird während dieses Phänomens reguliert (Lan *et al.*, 2002). Das Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_85910* ist als putative Acyl-CoA-Synthase für langkettige Fettsäuren beschrieben. *FAA21* kodiert für ein Protein, welches als *FAA2* in *S. cerevisiae* bekannt ist und dessen Transkription über Nrg1 und Mig1 reguliert wird (Murad *et al.*, 2001b). *FAA21* in *C. albicans*, das Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_82800*, sowie *FAA2* in *S. cerevisiae* sind zudem alle als putative Acyl-CoA-Synthasen beschrieben (Knoll *et al.*, 1994). Weiter zu nennen ist *LIP4* (*orf19.2133*) bzw. sein Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_65300*, die jeweils als putative Lipase genannt werden.

Im Vergleich zum erhaltenen Transkriptionsprofil mittels RNA-Seq zeigte das Profil der DNA-Microarrayanalyse eine größere Anzahl an Genen, die für Enzyme des Kohlenhydrat- bzw. Fettsäurestoffwechsels kodieren. Zudem wurden weniger mögliche Zielgene von *NRG1* identifiziert und das Transkriptionsprofil wurde nicht von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen dominiert, wie es bei der RNA-Seq der Fall war. *NRG1* selbst wurde unter den herunter regulierten Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp in Staib-Medium gefunden. Ebenfalls unter den 84 differentiell hoch regulierten Genen in *C. dubliniensis* und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante während des Wachstums in Staib-Medium vs. YPD-Medium wurde *RFX1* gefunden. Es ist als DNA-binding Protein bekannt und wird im Zusammenhang mit DNA-Reparatur, der Morphogenese und der Virulenz genannt (Hao *et al.*, 2009). In *C. dubliniensis* (*CD36_31600*) ist es als putatives RFX-like DNA-binding Protein beschrieben. Unter den 84 differentiell hoch regulierten Genen befanden sich u. a. noch *RBT4*. Die Expression von *RBT4* wird zum einen unter hypheninduzierenden Bedingungen herauf reguliert (Braun und Johnson, 2000; Sohn *et al.*, 2003) und zum anderen über α -Pheromon induziert (Dignard und Whiteway, 2006). *CD36_06570*, das Homolog in *C. dubliniensis*, ist als putatives Rbt4-Protein angegeben.

3.7.2 Ausgewählte Gene und deren Expressionswerte im DNA-Microarray

Mit Hilfe der DNA-Microarrayanalyse konnte zusätzlich zur RNA-Sequenzierung ein umfangreiches Set an differentiell regulierten Genen während des Wachstums des *C. albicans* Wildtyps, des *C. dubliniensis* Wildtyps und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante in Staib-Medium verglichen mit dem Wachstum in YPD-Medium zusammengestellt werden. Das Augenmerk wurde dabei, wie bereits erwähnt, auf die 84 differentiell herauf

regulierten Gene im *C. dubliniensis* Wildtyp und der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante gelegt. Um eine möglichst umfangreiche Auswahl an geeigneten Kandidaten aufzustellen, wurden neben den im Fokus stehenden 84 herauf regulierten Genen, zusätzlich auch alle anderen Transkriptionsprofile der Arrayanalyse sorgfältig auf mögliche interessante Kandidaten bzw. putativ chlamydosporenspezifischen Gene überprüft. Als solche interessanten Gene galten dann jene, die zum einen mit beiden Transkriptomanalysen identifiziert wurden, zum anderen solche, die durch bereits in der Literatur beschriebene Kenntnisse über Funktionen und/oder Eigenschaften des Genproduktes als vielversprechende Kandidaten auffällig waren, aber auf den ersten Blick nicht in das gesuchte Schema als „chlamydosporenspezifisch“ passten. Zudem wurden auch einige bisher noch uncharakterisierte Gene ausgewählt, da in beiden Analysen eine Vielzahl solcher Gene das Transkriptionsprofil bestimmte. In Tabelle 12 sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählten Kandidaten der mittels DNA-Microarrayanalyse identifizierten Gene sowie deren Expressionswerte aufgelistet und im Folgenden näher beschrieben.

Das Transkriptionsprofil das per DNA-Microarray erhalten wurde, zeigte, wie bereits erwähnt, eine geringere Anzahl von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen im Vergleich zur RNA-Sequenzierung. Unter den herauf regulierten Genen für den *C. dubliniensis* Wildtyp in Staib-Medium wurde u. a. *CD36_19040* als ein ebenfalls putatives Zellwandgen gefunden und somit als weiterer Kandidat ausgewählt. Das Homolog in *C. albicans orf19.4515* ist als uncharakterisiertes Protein beschrieben.

Orf19.3982 bzw. *CD36_54540* wurde unter 3.7.1 schon als putative Maltase näher beschrieben. Die Heraufregulation von *orf19.3982* bzw. *CD36_54540* in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante sowie im *C. dubliniensis* Wildtyp machte dieses Gen zu einem weiteren attraktiven Kandidaten auf der Suche nach chlamydosporenspezifischen Genen. Zudem wurde das verstärkte Vorkommen von differentiell herauf regulierten Genen, die im Zusammenhang mit Kohlenhydrat-bzw. Maltosestoffwechsel stehen, als eine interessante Gruppe an Kandidaten betrachtet. Es ist bekannt, dass die Chlamydosporenproduktion mit steigender Konzentration an Glukose vermindert wird (Hayes 1966; Kapica *et al.*, 1969; Janson und Nickerson, 1970b). Daher lag die Vermutung nahe, dass auch die Verfügbarkeit von Maltose einen Einfluss auf die Ausbildung von Chlamydosporen haben könnte. Als weiterer Kandidat dieser Gruppe ist *SUC1* zu nennen. Dieses Gen kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und reguliert die α -Glykosidase Expression. Ferner ermöglicht die Klonierung von *SUC1* in eine *S. cerevisiae SUC2*-Mutante deren Saccarose-

und Maltoseverwertung (Kelly und Kwon Chung, 1992). Das Homolog *CD36_34590* in *C. dubliniensis* ist als putatives Maltose-Fermentationsprotein beschrieben.

Tabelle 12: Expressionswerte der ausgewählten Kandidatengene im *C. dubliniensis* Wildtyp, in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und im *C. albicans* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium verglichen mit dem Wachstum in YPD-Medium.

		Relative Expression (log ₂ fold); Staib-Medium vs. YPD-Medium		
<i>C. dubliniensis</i> ID / <i>C. albicans</i> ID	Name	<i>C. dubliniensis</i> ^a	<i>C. albicans nrg1Δ</i>	<i>C. albicans</i>
<i>CD36_15800/</i> <i>orf19.2038</i>		11,57		
<i>CD36_01320/</i> <i>orf19.3330.3</i>	“ <i>POX18</i> “	8,70	1,00	
<i>CD36_28430/</i> <i>orf19.2395</i>	“ <i>IME2</i> “	5,81		
<i>CD36_31810/</i> <i>orf19.3885</i>		5,80	1,37	
<i>CD36_54540/</i> <i>orf19.3982</i>		4,48	3,66	
<i>CD36_19040/</i> <i>orf19.4515</i>		3,88		
<i>CD36_04250/</i> <i>orf19.6845</i>	“ <i>TF2</i> “	3,73		
<i>CD36_55050/</i> <i>Orf19.4046</i>	“ <i>TF1</i> “	3,21		
<i>CD36_80940/</i> <i>orf19.2506</i>		3,16	1,84	
<i>CD36_31600/</i> <i>orf19.3865</i>	“ <i>RFX1</i> “	3,05	0,60	
<i>CD36_87380/</i> <i>orf19.6741</i>		3,00	1,11	
<i>CD36_85150/</i> <i>orf19.5992</i>	“ <i>WOR2</i> “	2,40		
<i>CD36_06420/</i> <i>orf19.6224</i>		2,39	5,45	2,99
<i>CD36_34590/</i> <i>Orf19.7319</i>	“ <i>SUC1</i> “	2,36		
<i>CD36_23160/</i> <i>orf19.207</i>	“ <i>PGA55</i> “	1,98	3,15	
<i>CD36_44490/</i> <i>orf19.3794/</i>	“ <i>CSR1</i> “	1,61		

^a Expressionswerte der *C. dubliniensis*-Microarrays der Firma „febit“.

Weiterhin wurden die Gene als geeignete Kandidaten ausgewählt, die sowohl unter den 25 am stärksten herauf regulierten Genen bei der RNA-Sequenzierung zu finden waren als auch mittels DNA-Microarray identifiziert wurden. Dazu gehörten die bereits beschriebenen Gene *POX18* (*CD36_01320*) und *PGA55* (*CD36_23160*). Die Gene *orf19.3885* (*CD36_31810*), *orf19.2506* (*CD36_80940*) und *orf19.6741* (*CD36_87380*)

wurden ebenfalls in beiden Transkriptionsprofilen identifiziert. *Orf19.3885* ist in *C. albicans* als uncharakterisiertes Protein beschrieben und in *C. dubliniensis* als putative N-Acetyltransferase. *Orf19.2506* ist als ein opaque-spezifisches Gen erwähnt (Tsong *et al.*, 2003) und das entsprechende Homolog in *C. dubliniensis* wurde bisher als hypothetisches Protein beschrieben. *Orf19.6741* ist als Zielgen von Nrg1 mit noch unbekannter Funktion und in *C. dubliniensis* als putatives Zellmembranprotein beschrieben.

Als noch uncharakterisiertes Gen wurde u. a. *orf19.6224* identifiziert, dessen Homolog in *C. dubliniensis* *CD36_06420* als putativer Membrantransporter beschrieben ist. Als weiteres uncharakterisiertes Gen wurde *orf19.2038* bzw. *CD36_15800* ausgewählt und war zudem das am stärksten exprimierte Gen in der Microarrayanalyse. Da diese Gene bisher noch nicht näher charakterisiert wurden und durch ihre erhöhte Expression während des Wachstums unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen auffielen, waren sie für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse.

Da die biologische Funktion der Chlamydosporen bisher nicht geklärt ist und sowohl das Transkriptionsprofil der RNA-Seq als auch das der DNA-Microarrays einige Gene beinhaltete, die zuvor mit Mating oder Switching in *C. albicans* genannt wurden, erschien das Gen *IME2* ebenfalls als interessanter und geeigneter Kandidat. Es ist sowohl in *C. albicans* (*orf19.2395*) als auch in *C. dubliniensis* (*CD36_28430*) als putative Serin/Threoninkinase beschrieben. In *S. cerevisiae* ist die Proteinkinase Ime2 zudem als wichtiger Regulator der Meiose und Sporulation bekannt (Foiani *et al.*, 1996; Guttman-Raviv *et al.*, 2002).

Aufgrund von bereits in der Literatur beschriebenen und ausführlich in der Einleitung dargestellten Eigenschaften wurde das Gen *CSR1* ausgewählt. *CSR1* (*orf19.3794/CD36_44490*) kodiert in *C. albicans* für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und ist das Homolog zu *ZAP1* in *S. cerevisiae* (Zhao und Eide, 1997). In *C. dubliniensis* ist *CD36_44490* ebenfalls als möglicher Zinkfinger-Transkriptionsfaktor beschrieben.

Für alle hier ausgewählten und beschriebenen Gene wurden in dieser Arbeit Deletionsmutanten im Hintergrund des *C. dubliniensis* Wü284 hergestellt (siehe 3.8). Für das Gen *IME2* wurde zusätzlich eine Deletionsmutante in *C. albicans* erzeugt.

Für die Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845* wurden in *C. albicans* Überexpressionsstämme hergestellt. *WOR2* ist als transkriptioneller Regulator des white-opaque-Switchings bekannt und wird zudem für die Erhaltung der opaque-Phase benötigt (Zordan *et al.*, 2007). Sein Homolog *CD36_85150* in *C. dubliniensis* ist als putativer Transkriptionsfaktor beschrieben. Aufgrund der bereits beschriebenen Eigenschaften von

RFX1 (3.7.1) als DNA-binding Protein und *WOR2* als transkriptioneller Regulator des white-opaque-Switchings wurden diese Gene als weitere Kandidaten ausgewählt.

Tabelle 13: Übersicht der Expressionswerte der ausgewählten bzw. in dieser Arbeit bearbeiteten Gene, die mittels RNA-Seq erhalten wurden, in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und im *C. dubliniensis* Wildtyp im Vergleich zum *C. albicans* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium.

<i>C. albicans</i> ID	Name	<i>C. dubliniensis</i> ID	Relative Expression (log ₂ fold)	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i> vs. <i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i> vs. <i>C. albicans</i>
<i>orf19.3512</i>	“ <i>CSP1</i> ”	<i>CD36_30750</i>	9.60	17.20
<i>orf19.4170</i>	“ <i>CSP2</i> ”	<i>CD36_40770</i>	8.47	12.31
<i>orf19.6741</i>		<i>CD36_87380</i>	5.35	8.82
<i>orf19.3330.3</i>	“ <i>POX18</i> ”	<i>CD36_01320</i>	4.34	7.04
<i>orf19.207</i>	“ <i>PGA55</i> ”	<i>CD36_23160</i>	4,84	6,93
<i>orf19.3885</i>		<i>CD36_31810</i>	3.93	7.48
<i>orf19.2395</i>	“ <i>IME2</i> ”	<i>CD36_28430</i>	3,12	3,10
<i>orf19.2506</i>		<i>CD36_80940</i>	2.48	4.55
<i>orf19.3865</i>	“ <i>RFX1</i> ”	<i>CD36_12010</i>	1,90	3,8
<i>orf19.3982</i>		<i>CD36_54540</i>	1,44	8,64
<i>orf19.6224</i>		<i>CD36_06420</i>	0,98	0,35
<i>orf19.2038</i>		<i>CD36_15800</i>	0,88	2,29
<i>orf19.5992</i>	“ <i>WOR2</i> ”	<i>CD36_85150</i>	0,74	-1,31
<i>orf19.4515</i>		<i>CD36_19040</i>	0,71	10,54
<i>orf19.4046</i>		<i>CD36_55050</i>	0,56	1,64
<i>orf19.6845</i>		<i>CD36_04250</i>	0,36	-2,98
<i>orf19.7319</i>	“ <i>SUC1</i> ”	<i>CD36_34590</i>	-0,17	-1,26
<i>orf19.3794</i>	“ <i>CSR1</i> ”	<i>CD36_44490</i>	-0,61	-2,02

Orf19.4046 (*CD36_55050*) und *orf19.6845* (*CD36_04250*) kodieren für noch uncharakterisierte, putative Transkriptionsfaktoren, deren Homologe in *C. dubliniensis* als hypothetische Proteine verzeichnet sind. In dieser Arbeit wurde *orf19.4046* auch als TF1 (Transkriptionsfaktor 1) und *orf19.6845* als TF2 (Transkriptionsfaktor 2) bezeichnet

(Tabelle 1,2 und 3). Durch die Beschreibung als putative Transkriptionsfaktoren und deren erhöhte Expression unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen, wurden die beiden identifizierten Gene *orf19.4046* und *orf19.6845* als weitere geeignete Kandidaten ausgewählt. Zum Vergleich für die in Tabelle 12 aufgelisteten Ergebnisse der DNA-Microarrayanalyse der ausgewählten Gene, sind in Tabelle 13 zusätzlich deren Expressionswerte, die mittels RNA-Seq erhalten wurden, dargestellt.

3.7.3 Quantitative Real-Time-RT-PCR zum Nachweis der Genexpression ausgewählter Gene

Der zweite Teil der Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarray führte zur Identifizierung weiterer möglicher chlamydosporenspezifischer Gene. Die Überprüfung der Expressionswerte erfolgte dabei für die Gene *CD36_15800* und *CdCSR1* (*CD36_44490*) in drei biologischen Replikaten. *CD36_15800* wurde als am stärksten hoch reguliertes Gen des *C. dubliniensis* DNA-Microarray und *CdCSR1* (*CD36_44490*) als deutlich schwächer herauf reguliertes Gen der DNA-Microarrays identifiziert. Als endogene Kontrolle wurde das *ACT1*-Gen von *C. dubliniensis* verwendet. Für alle Gene wurde die Darstellung des Fold Change (FC) gewählt.

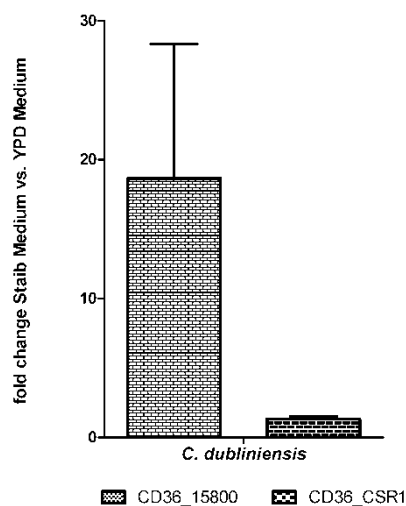


Abb. 20: qRT-PCR zur Überprüfung der Expression ausgewählter Gene. Dargestellt ist der Fold Change der Expression der Gene *CD36_15800* und *CdCSR1* (*CD36_44490*) im *C. dubliniensis* Wildtyp nach 28-stündigem Wachstum der Stämme in Staib-Medium verglichen mit YPD-Medium; (MW±SD; n=3).

Die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigten die starke Expression des Gens *CD36_15800* im *C. dubliniensis* Wildtyp. *CD36_15800* wurde > 18-fach im *C. dubliniensis* Wü284 während des Wachstums in Staib-Medium hoch reguliert im Vergleich zum YPD-Medium. *CdCSR1* wurde dagegen sehr viel schwächer (> 2-fach) im *C. dubliniensis* Wü284 während des Wachstums in Staib-Medium im Vergleich zum YPD-Medium hoch reguliert.

Mit diesen Ergebnissen konnten die erhaltenen Expressionswerte der DNA-Microarrayanalyse bestätigt werden.

3.8 Konstruktion von Deletionsmutanten in den ausgewählten Genen

Da die Funktion der Chlamydosporen bislang nicht geklärt ist, wurde bei der Auswahl weiterer geeigneter Kandidaten Wert auf eine Vielfältigkeit bzw. Unterschiedlichkeit in deren bereits bekannten Eigenschaften/Funktionen gelegt. Zudem waren auch bisher noch uncharakterisierte Gene von großem Interesse. Mit der Herstellung von Deletionsmutanten sollte überprüft werden, ob die ausgewählten Gene bei der Chlamydosporenbildung eine Rolle spielen, d. h. ob der Funktionsverlust eines dieser Gene bereits zu einer gestörten Ausbildung dieser morphologischen Struktur führt. Außerdem war es von Bedeutung herauszufinden, ob die Deletionsmutanten unter anderen, nicht chlamydosporeninduzierenden Wachstumsbedingungen, Veränderungen im Vergleich zum wildtypischen Stamm aufzeigen. Diese anderen getesteten Bedingungen wurden mit den bereits für das jeweilige Gen bekannten Eigenschaften abgestimmt. Die Deletionsmutanten wurden mit Hilfe der SAT1-Flipper Technik (Reuss *et al.*, 2004) für die *C. dubliniensis* Gene *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_44490* (*CdCSR1*), *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*) und *CD36_34590* (*CdSUC1*) hergestellt. In *C. albicans* wurde für das Gen *IME2* ebenfalls eine Deletionsmutante hergestellt. Zunächst wurden dafür Plasmide hergestellt, die spezifische Deletionskassetten aller aufgezählten Gene enthielten. Durch Transformation des *C. dubliniensis* Wü284 bzw. des *C. albicans* SC5314 mit diesen Konstrukten und anschließendem Recycling des Selektionsmarkers war es möglich, die entsprechenden Gene zu deletieren. Im Folgenden ist die Konstruktion der Plasmide und der rekombinanten *C. dubliniensis*-Stämme bzw. des *C. albicans*-Stammes beschrieben.

3.8.1 Konstruktion der Deletionskassetten

Wie bereits unter 3.4.1 beschrieben, sind alle in dieser Arbeit hergestellten Deletionskassetten von dem Plasmid pSSU1M2 abgeleitet, welches den SAT1-Flipper enthält. Im Folgenden ist die Konstruktion der Deletionskassetten beispielhaft für das Gen *CdCSR1* (*CD36_44490*) beschrieben und wurde für alle aufgeführten Gene in gleicher Vorgehensweise durchgeführt. Für die Herstellung der Deletionskonstrukte wurden die

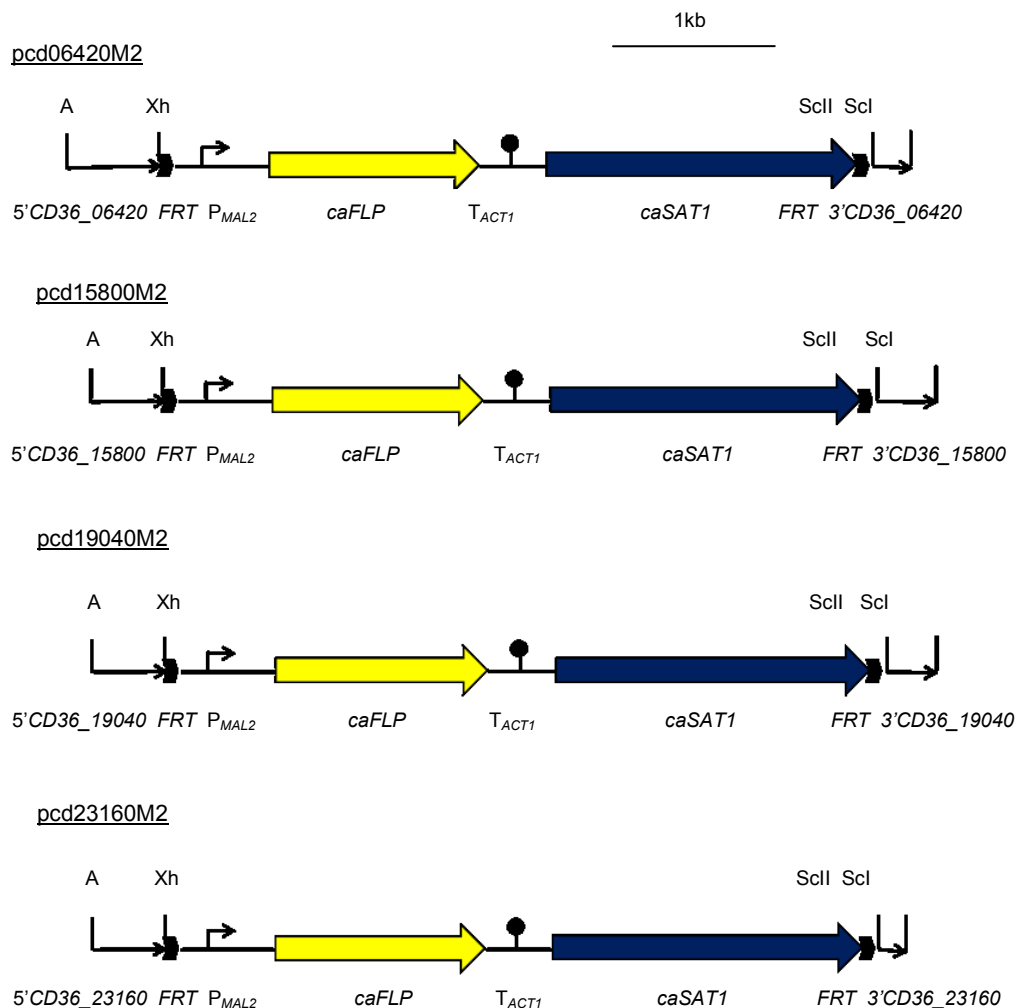
entsprechenden homologen Bereiche zur spezifischen Integration ausgetauscht. Dafür wurde der upstream-Bereich des Gens *CdCSR1* mit dem Primer-Paar CD36_CSR1-1/CD36_CSR1-2 und genomischer DNA des *C. dubliniensis* Wildtyp-Stammes Wü284 als Template mittels PCR amplifiziert und als *ApaI/XhoI*-Fragment in das *ApaI/XhoI*-gespaltene Plasmid pSSU1M2 kloniert. In das daraus resultierende Plasmid pcdCSR1M1 wurde anschließend der downstream-Bereich kloniert. Für die Amplifizierung des downstream-Bereiches wurde das Primer-Paar CD36_CSR1-3/CD36_CSR1-4 verwendet. Das entstandene PCR-Produkt wurde dann als *SacI/SacII*-Fragment in das *SacI/SacII*-gespaltene Vorgängerplasmid pcdCSR1M1 ligiert. Dabei wurde schließlich das Plasmid pcdCSR1M2 gewonnen, welches die fertige Deletionskassette enthielt (Abbildung 21). Tabelle 14 zeigt die verwendeten Templates, Primer, eingefügten Schnittstellen und die Konstruktionsweise aller hergestellten Deletionskassetten.

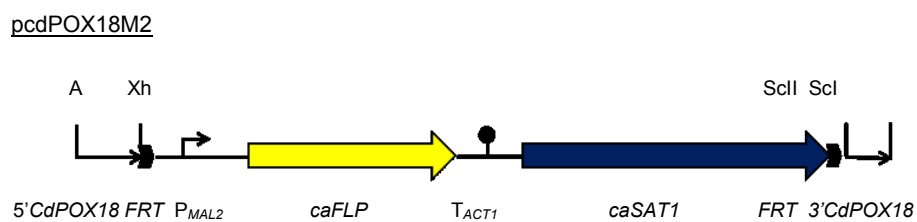
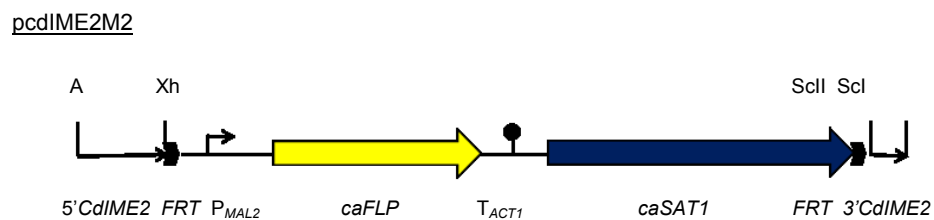
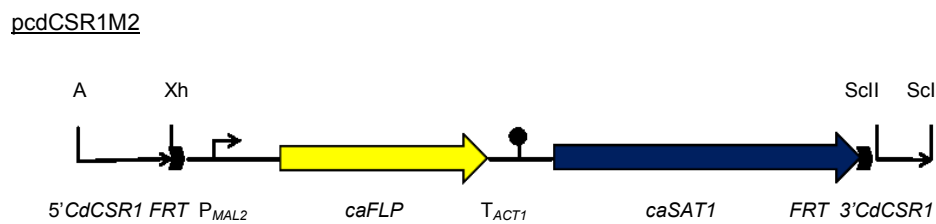
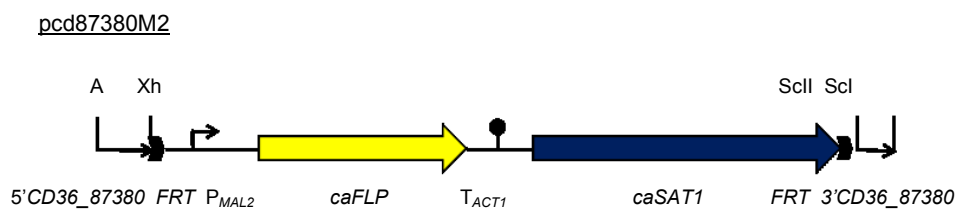
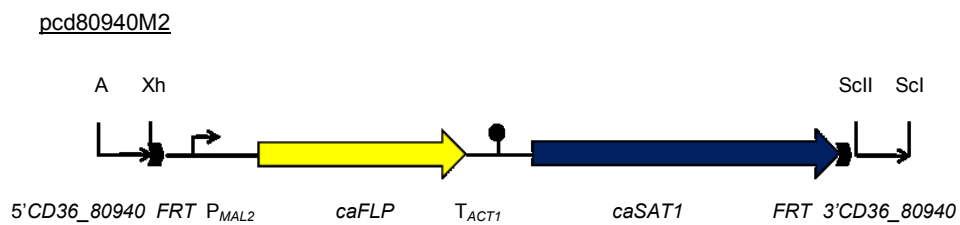
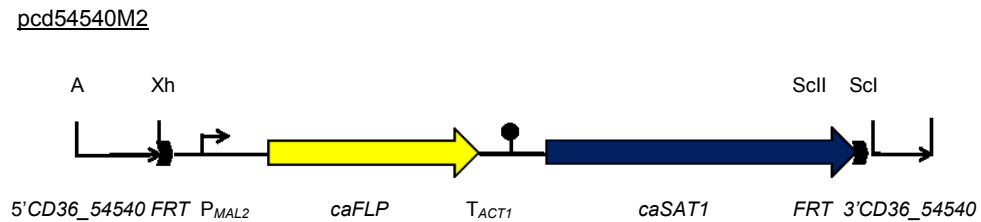
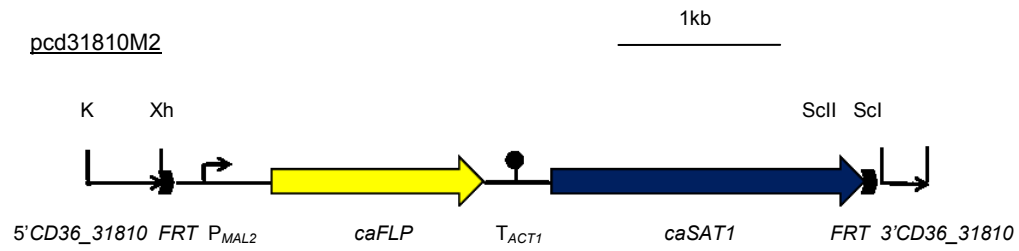
Tabelle 14: Verwendete Templates, Primer, eingefügte Schnittstellen und Konstruktionsweisen der Deletionskassetten für die Gene *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_44490* (*CdCSR1*), *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*) und *CD36_34590* (*CdSUC1*) sowie *IME2* und deren Vorstufen. Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Gens. (A von ATG = +1)

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_06420-1 CD36_06420-2	<i>ApaI</i> -site bei -578 <i>XhoI</i> -site bei +5	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcd06420M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_06420-3 CD36_06420-4	<i>SacII</i> -site bei +1469 <i>SacI</i> -site bei +1704	<i>SacII/SacI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacII/SacI</i> -gespaltenes pcd06420M1	pcd06420M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_15800-3 CD36_15800-4	<i>ApaI</i> -site bei -478 <i>XhoI</i> -site bei -17	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcd15800M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_15800-3 CD36_15800-4	<i>SacII</i> -site bei +893 <i>SacI</i> -site bei +1253	<i>SacII/SacI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacII/SacI</i> -gespaltenes pcd15800M1	pcd15800M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_19040-1 CD36_19040-2	<i>ApaI</i> -site bei -467 <i>XhoI</i> -site bei -19	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcd19040M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_19040-3 CD36_19040-4	<i>SacII</i> -site bei +736 <i>SacI</i> -site bei +1051	<i>SacII/SacI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>SacII/SacI</i> -gespaltenes pcd19040M1	pcd19040M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_23160-1 CD36_23160-2	<i>ApaI</i> -site bei -441 <i>XhoI</i> -site bei -7	<i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI/XhoI</i> -gespaltenes pSSU1M2	pcd23160M1

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_23160-3 CD36_23160-4	<i>Sac</i> II-site bei +2361 <i>Sac</i> I-site bei +2657	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcd231640M1	pcd23160M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_31810-1 CD36_31810-2	<i>Kpn</i> I-site bei -472 <i>Xho</i> I-site bei -2	<i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcd31810M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_31810-3 CD36_31810-4	<i>Sac</i> II-site bei +895 <i>Sac</i> I-site bei +1186	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcd31810M1	pcd31810M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_54540-1 CD36_54540-2	<i>Apa</i> I-site bei -511 <i>Xho</i> I-site bei +7	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcd54540M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_54540-3 CD36_54540-4	<i>Sac</i> II-site bei +1378 <i>Sac</i> I-site bei +1764	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcd54540M1	pcd54540M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_80940-1 CD36_80940-2	<i>Apa</i> I-site bei -341 <i>Xho</i> I-site bei -2	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcd80940M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_80940-3 CD36_80940-4	<i>Sac</i> II-site bei +1600 <i>Sac</i> I-site bei +1926	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcd80940M1	pcd80940M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_87380-1 CD36_87380-2	<i>Apa</i> I-site bei -359 <i>Xho</i> I-site bei -4	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcd87380M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_87380-3 CD36_87380-4	<i>Sac</i> II-site bei +1292 <i>Sac</i> I-site bei +1535	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcd87380M1	pcd87380M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_CSR1-1 CD36_CSR1-2	<i>Apa</i> I-site bei -454 <i>Xho</i> I-site bei +22	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcdCSR1M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_CSR1-3 CD36_CSR1-4	<i>Sac</i> II-site bei +2092 <i>Sac</i> I-site bei +2446	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdCSR1M1	pcdCSR1M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_IME2-1 CD36_IME2-2	<i>Apa</i> I-site bei -558 <i>Xho</i> I-site bei +3	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcdIME2M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_IME2-3 CD36_IME2-4	<i>Sac</i> II-site bei +1464 <i>Sac</i> I-site bei +1675	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdIME2M1	pcdIME2M2
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_POX18-1 CD36_POX18-2	<i>Apa</i> I-site bei -384 <i>Xho</i> I-site bei +20	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcdPOX18M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_POX18-3 CD36_POX18-4	<i>Sac</i> II-site bei +397 <i>Sac</i> I-site bei +673	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdPOX18M1	pcdPOX18M2

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_SUC1-1 CD36_SUC1-2	<i>Apa</i> I-site bei -386 <i>Xho</i> I-site bei +8	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pcdSUC1M1
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_SUC1-3 CD36_SUC1-4	<i>Sac</i> II-site bei +1135 <i>Sac</i> I-site bei +1469	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdSUC1M1	pcdSUC1M2
<i>C. albicans</i> SC5314	CaIME2-1 CaIME2-2	<i>Apa</i> I-site bei -531 <i>Xho</i> I-site bei +3	<i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Apa</i> I/ <i>Xho</i> I-gespaltenes pSSU1M2	pIME2M1
<i>C. albicans</i> SC5314	CaIME2-3 CaIME2-4	<i>Sac</i> II-site bei +1460 <i>Sac</i> I-site bei +1690	<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pIME2M1	pIME2M2





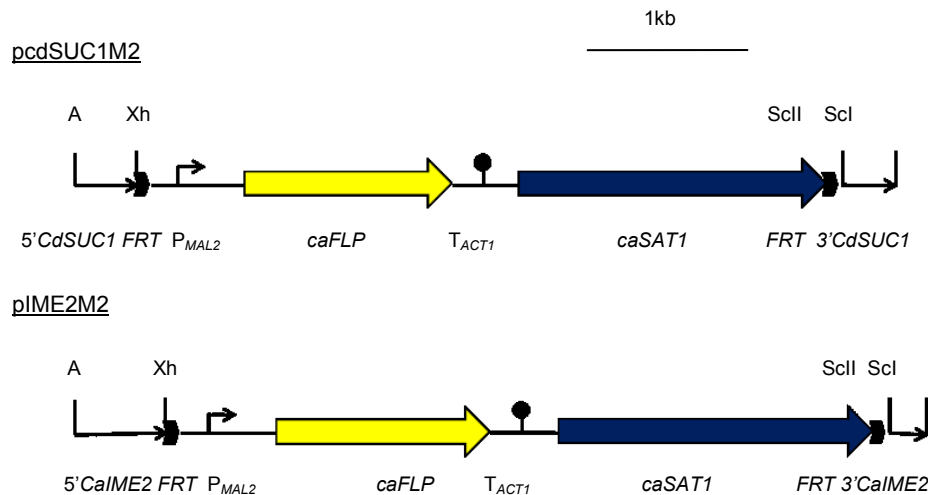


Abb. 21: DNA-Kassetten zur Deletion der Gene *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_44490* (*CdCSR1*), *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*), *CD36_34590* (*CdSUC1*) und *IME2*. Die linearen Transformationsfragmente können als *ApaI/SacI*-bzw. *KpnI/SacI*-Fragmente aus den abgebildeten Plasmiden herausgespalten werden. Alle Kassetten enthalten den *SAT1*-Flipper, bestehend aus dem *caSAT1*-Gen als dominanten Selektionsmarker (blauer Pfeil), dem *caFLP*-Gen (gelber Pfeil) unter Kontrolle des induzierbaren *MAL2*-Promotors (abgewinkelter Pfeil) vor dem *ACT1*-Transkriptionsterminator (Kreis) und den flankierenden Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase, den *FRT*-sites (schwarze Pfeile; nicht im Maßstab dargestellt). Der Flipper ist stets von spezifischen 5'- und 3'-Bereichen des Zielgens flankiert und ermöglicht so die ortsspezifische Integration durch homologe Rekombination. Für die Klonierung relevante Schnittstellen sind angegeben: A, *ApaI*; K, *KpnI*; Scl, *SacI*; SclI, *SacII*; Xh, *XhoI*.

3.8.2 Konstruktion der Komplementationskassette des Gens *CdCSR1*

Um die *CdCSR1* (*CD36_44490*)-Mutante mit dem intakten *CdCSR1*-Gen zu komplementieren, wurde ein entsprechendes Konstrukt für die *C. dubliniensis*-Transformation hergestellt. Mit dem Primer-Paar CD36_CSR1-1/CD36_CSR1-5 und genomischer DNA des *C. dubliniensis* Wildtyp-Stammes Wü284 als Template wurde zunächst mittels PCR das *CdCSR1*-Gen amplifiziert und als *ApaI/BglII*-Fragment anstelle des 5'*MEPI*-Fragmentes in das *ApaI/BglII*-gespaltene Plasmid pSAP2KS1 kloniert. Die *BglII*-site wurde direkt nach dem Stopcodon eingeführt. Das daraus resultierende Plasmid wurde als pcdCSR1K1 bezeichnet. Aus dem Plasmid pcdCSR1M2 wurde schließlich das *SacII/SacI*-3'*CdCSR1*-Fragment anstelle des 3'*SAP2*-Fragmentes in das *SacII/SacI*-gespaltene pcdCSR1K1 kloniert, um pcdCSR1K2 zu erhalten. Das Plasmid pcdCSR1K2 enthielt schließlich die fertige Komplementationskassette. In Tabelle 15 sind die verwendeten Primer und Schnittstellen sowie die Konstruktion der Komplementationskassette zusammengefasst. Abbildung 22 stellt das hergestellte Konstrukt schematisch dar.

Tabelle 15: Konstruktion der Komplementationskassette für das Gen *CdCSR1* (*CD36_44490*). Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des Gens. (A von ATG = +1)

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. dubliniensis</i> Wü284	CD36_CSR1-1 CD36_CSR1-5	<i>ApaI</i> -site bei -454 <i>Bgl</i> III-site bei +2092	<i>ApaI</i> / <i>Bgl</i> III-gespaltenes PCR-Produkt in <i>ApaI</i> / <i>Bgl</i> III-gespaltenes pSAP2KS1	pcdCSR1K1
			<i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes 3' <i>CdCSR1</i> -Fragment aus pcdCSR1M2 in <i>Sac</i> II/ <i>Sac</i> I-gespaltenes pcdCSR1K1	pcdCSR1K2

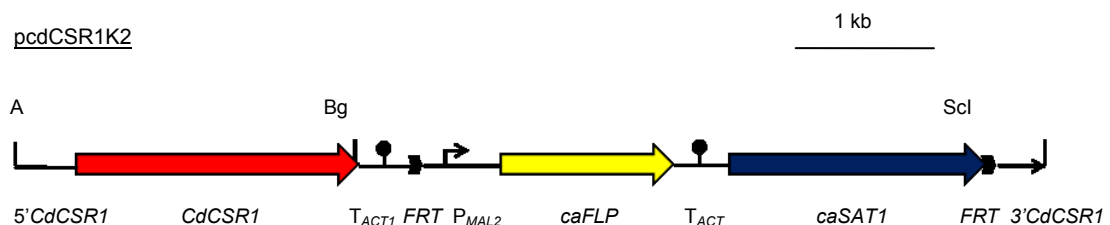


Abb. 22: Komplementationskassette für die Reintegration einer funktionellen Kopie des Gens *CdCSR1* (*CD36_44490*) im angezeigten Plasmid. Die Kassette enthält den *SAT1*-Flipper (*caSAT1*-Gen, blauer Pfeil; *caFLP*-Gen, gelber Pfeil; *P_{MAL2}*, abgewinkelter Pfeil; *T_{ACT1}*, Kreis) mit den flankierenden *FRT*-sites (schwarze Pfeile; nicht im Maßstab dargestellt). Nach der ortsspezifischen Integration durch homologe Rekombination in den spezifischen 5'- und 3'-Bereichen des Zielgens kann der Selektionsmarker wieder aus dem Genom entfernt werden. Letztlich kommt es zu Reintegration der kodierenden Region des Gens *CdCSR1* (roter Pfeil) vor dem *ACT1*-Terminator (Kreis) ins Genom. Die Komplementanten sind wie der Wildtyp-Stamm Nourseothricin-sensitiv. Für die Klonierung relevante Schnittstellen sind angegeben: A, *ApaI*; B, *Bgl*III; Scl, *SacI*.

3.8.3 Konstruktion der *C. dubliniensis*-Einzelmutanten am Beispiel *CdCSR1* und Komplementation des Gens *CdCSR1*

Für die Herstellung der *C. dubliniensis*-Mutanten in den Genen *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_44490* (*CdCSR1*), *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*) und *CD36_34590* (*CdSUC1*) wurde der Ausgangsstamm Wü284 verwendet. Zur Deletion des Gens *IME2* in *C. albicans* fand der Ausgangsstamm SC5314 Verwendung. Im Folgenden ist die Herstellung der Deletionsmutante beispielhaft für das Gen *CdCSR1* (*CD36_44490*) beschrieben und wurde für alle aufgeführten Gene in gleicher Vorgehensweise durchgeführt. Der Ausgangsstamm *C. dubliniensis* Wü284 wurde mit dem linearen *ApaI*/*SacI*-Fragment aus dem Plasmid pcdCSR1M2 transformiert. Wie im Material und Methoden Teil ausführlich beschrieben, wurden Nourseothricin-resistente

Für die Komplementierung der *CdCSR1*-Deletion wurden die Stämme CdCSR1M4A und CdCSR1M4B mit dem *ApaI/SacI*-Fragment aus pcdCSR1K2 transformiert. Dieses *ApaI/SacI*-Fragment wurde verwendet, um das *CdCSR1*-Gen in eines der zerstörten *Cdcsr1Δ*-Allele der Mutanten CdCSR1M4A und CdCSR1M4B zu reintegrieren. Die spezifische Integration der Kassette in den resultierenden Transformanten CdCSR1K1A und CdCSR1K1B wurde mit *CdCSR1*-spezifischen up- und downstream-Sonden per Southern-Hybridisierung überprüft (Abbildung 24B). Die *CdCSR1*-komplementierten Stämme CdCSR1K2A und CdCSR1K2B wurden schließlich nach FLP-vermittelter Exzision des Flippers erhalten. In diesem ist ein *CdCSR1*-Allel an seinem Originallokus vor dem *ACT1*-Terminator integriert (Abbildung 24A).

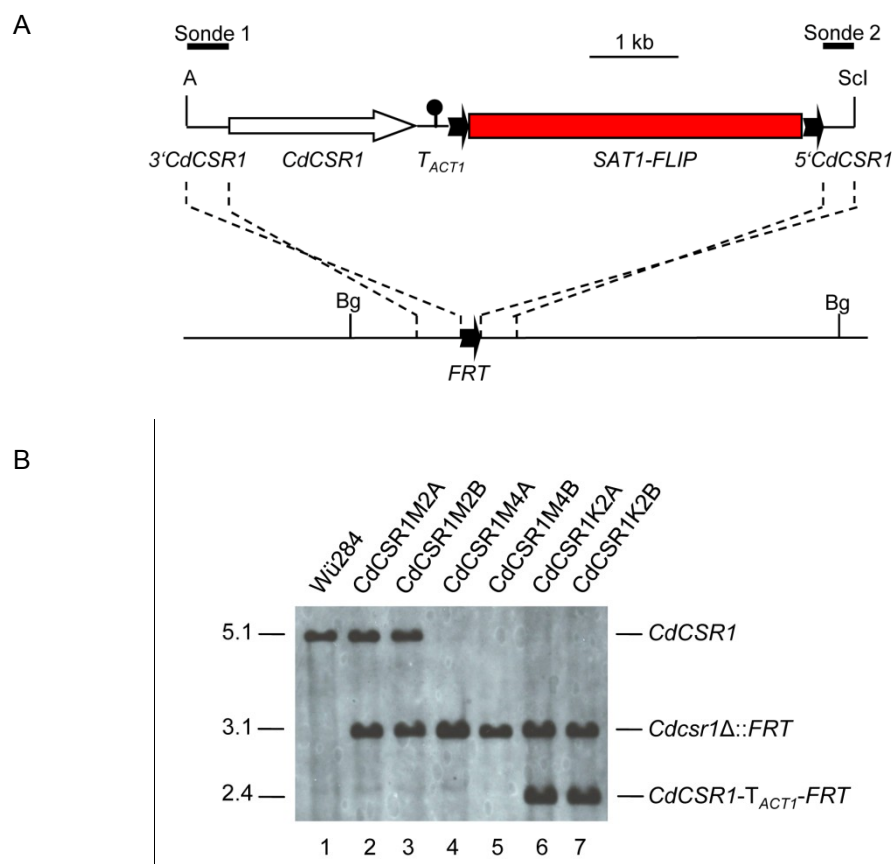


Abb. 24: Komplementierung der *Cdcsr1Δ*-Mutanten. (A) Aufbau der Flipper-Kassette aus pcdCSR1K2 (oben) zur Reintegration eines funktionellen Allels in den Originallokus der *CdCSR1Δ*-Mutanten (unten). Die kodierende Region des *Cdcsr1*-Allels ist als weißer Pfeil dargestellt, die up- und downstream-Regionen als durchgezogene schwarze Linien, der *SAT1*-Flipper mit den flankierenden *FRT*-sites (schwarze Pfeile, nicht im Maßstab gezeichnet) als blauer Balken, ein schwarzer Kreis zeigt den *ACT1*-Terminator. Die zur Überprüfung genutzten Sonden für die Southern-Hybridisierung sind als schwarze Balken abgebildet. Relevante Schnittstellen sind eingezeichnet: A, *ApaI*; Bg, *Bgl*II; ScI, *SacI*; ScI, *SacI*. (B) Southern-Hybridisierung *Bgl*II-verdauter genomischer DNA des Wildtyp-Stammes Wü284 (Spur 1), der heterozygoten Mutanten CdCSR1M2A/B (Spur 2/3), der homozygoten Mutanten CdCSR1M4A/B (Spur 4/5), sowie der Komplementanten CdCSR1K2A/B (Spur 6/7) mit der Sonde 1. Die Größen (in kb) der hybridisierenden Fragmente sind jeweils auf der linken Seite angezeigt, deren Identität rechts.

3.9 Überexpression der Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845* unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors

Neben den zahlreichen Deletionsmutanten wurden in dieser Arbeit auch Überexpressionsstämme hergestellt. Dafür wurden die Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845* unter die Kontrolle des konstitutiv exprimierten *ADHI*-Promotors gestellt und in den *ADHI*-Lokus des *C. albicans* Wildtyp-Stammes SC5314 integriert. Für die hergestellten Überexpressionsstämme stellte sich die Frage, ob eine verstärkte Expression dieser Gene zum einen Einfluss auf die Ausbildung bzw. Entwicklung der Chlamydosporen haben könnte und zum anderen, ob Veränderungen hinsichtlich der Filamentierung auftreten.

3.9.1 Konstruktion der Expressionskassetten und Überexpressionsstämme

Für die Herstellung der Expressionskonstrukte wurden die kodierenden Regionen der *C. albicans* Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* (TF 1) und *orf19.6845* (TF 2) mit den Primer-Paaren CaRFX1-1/CaRFX1-2, CaWOR2-1/CaWOR2-2, CaTF1-1/CaTF1-2 und CaTF2-1/CaTF2-2 und genomischer DNA des *C. albicans* Wildtyp-Stammes SC5314 als Template mittels PCR amplifiziert. Die Primer CaRFX1-1, CaWOR2-1, CaTF1-1 und CaTF2-1 enthalten eine *XhoI*-site, die direkt vor dem Startcodon des jeweiligen Gens eingeführt wird. Zusätzlich enthalten die Primer vor der *XhoI*-site drei A sowie die Sequenz ATATA. Die Primer CaRFX1-2, CaWOR2-2, CaTF1-2 und CaTF2-2 enthalten die Sequenz ATATA und eine *BglII*-site, die direkt nach dem Stoppcodon eingeführt wurde. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend an der eingeführten Schnittstelle gespalten und als *XhoI/BglII*-Fragment zwischen P_{ADHI} und T_{ACTI} in den *XhoI/BglII*-gespaltenen Vektor pADH1E2 kloniert. In Tabelle 16 sind die verwendeten Primer und Schnittstellen, die Konstruktion der Überexpressionsskassetten sowie die Namen der erhaltenen Plasmide zusammengefasst. Abbildung 25 zeigt den Aufbau der Expressionskassette am Beispiel von *WOR2*.

Tabelle 16: Verwendete Templates, Primer, eingefügte Schnittstellen und Konstruktionsweisen der Expressionskassetten für die Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* (TF1) und *orf19.6845* (TF1). Positionsangaben beziehen sich auf das Startcodon des jeweiligen Gens. (A von ATG = +1)

Template	Primer	Eingefügte Schnittstellen	Konstruktion	Resultierendes Plasmid
<i>C. albicans</i> SC5314	CaRFX1-1 CaRFX1-2	<i>Xho</i> I-site <i>Bgl</i> II-site	<i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes pADH1E2	pRFX1E1
<i>C. albicans</i> SC5314	CaWOR2-1 CaWOR2-2	<i>Xho</i> I-site <i>Bgl</i> II-site	<i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes pADH1E2	pWOR2E1
<i>C. albicans</i> SC5314	CaTF1-1 CaTF1-2	<i>Xho</i> I-site <i>Bgl</i> II-site	<i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes pADH1E2	pTF1E1
<i>C. albicans</i> SC5314	CaTF2-1 CaTF2-2	<i>Xho</i> I-site <i>Bgl</i> II-site	<i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes PCR-Produkt in <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II-gespaltenes pADH1E2	pTF2E1

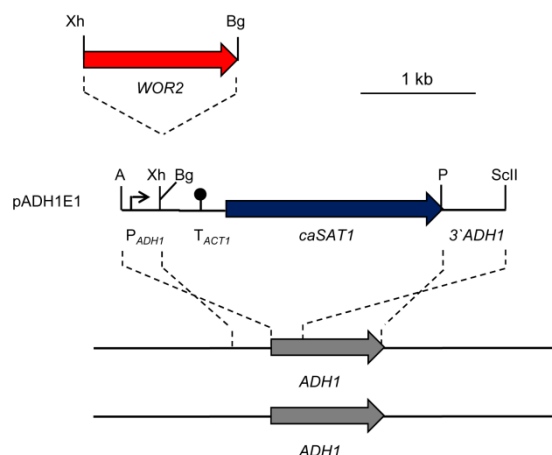


Abb. 25: Aufbau einer Expressionskassette, die verwendet wurde, um die Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* (TF1) und *orf19.6845* (TF1) unter der Kontrolle des konstitutiven *ADH1*-Promotors im *C. albicans* Wildtyp zu exprimieren. In der Abbildung dargestellt ist das Plasmid pADH1E2, in welches zwischen P_{ADH1} und T_{ACT1} die Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845* kloniert wurden (hier beispielhaft für *WOR2*). Relevante Schnittstellen sind eingezeichnet: A, *Apa*I; Bg, *Bgl*II; P, *Pst*I; ScII, *Sac*II; Xh, *Xho*I.

Alle Plasmide konnten als *Apa*I/*Sac*II-Fragment über homologe Rekombination in den *ADH1*-Lokus des *C. albicans* Stammes SC5314 integriert werden.

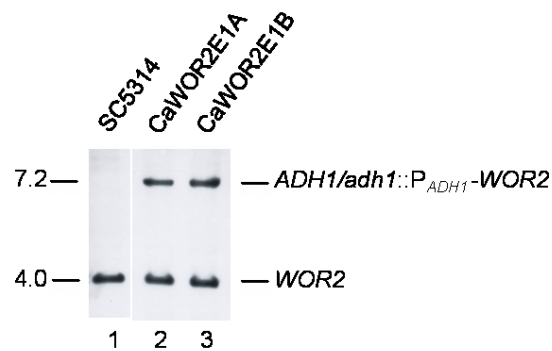


Abb. 26: Southern-Hybridisierung *Xba*I-gespaltener genomischer DNA des Ausgangsstammes SC5314 und den angegebenen Transformanten (beispielhaft für das Gen *WOR2*). Spur 1: *C. albicans* Wildtyp, Spur 2/3: Überexpressionsstämme CaWOR2E1A/B. Die Größen (in kb) der hybridisierenden Fragmente sind jeweils auf der linken Seite angezeigt, deren Identität rechts.

3.10 Phänotypische Analyse der *C. dubliniensis* *Cdcsr1*Δ-Mutante

CSR1 kodiert in *C. albicans* für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, dessen Deletion einen Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen bewirkte. Zudem wiesen die *csr1*Δ-Deletionsmutanten unter hypheninduzierenden Bedingungen ein Defekt im filamentösen Wachstum auf (Bird *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008). Durch die Heraufregulation dieses Gens im DNA-Microarray für den *C. dubliniensis* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium vs. YPD-Medium und den genannten und bekannten Eigenschaften, wurde *CSR1* als interessanter Kandidat und weiteres mögliches chlamydosporenspezifisches Gen ausgewählt. Dabei war für diese Arbeit zum einen von Interesse, ob *csr1*Δ-Mutanten für *C. dubliniensis* sich unter den beschriebenen Bedingungen genauso oder ähnlich verhalten, wie *csr1*Δ-Mutanten für *C. albicans* oder ob es in diesem Fall weitere Unterschiede zwischen den eng verwandten *Candida*-Spezies zu beobachten gibt. Neben der Identifikation chlamydosporenspezifischer Gene ist es ebenfalls von Bedeutung, weitere spezifische Bedingungen bzw. Umweltfaktoren für deren Induktion zu bestimmen, um so möglicherweise neue Erkenntnisse für die biologische Rolle und/oder genetische Regulation von Chlamydosporen zu erlangen. In diesem Zusammenhang sollten auch Nährstoffe wie Zink betrachtet werden, wobei sich im Fall von *CSR1* die Frage stellt, ob neben dem Einfluss von Zink auf das Hyphenwachstum einer *csr1*Δ-Mutante, auch die Chlamydosporenbildung beeinträchtigt ist.

3.10.1 Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen

Die *Cdcsr1*Δ-Mutante wurde zunächst auf ihr Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen überprüft. Dafür wurden die Zellen der zu untersuchenden Stämme zum einen für 28 h bei 25°C in Staib-Medium, zum anderen für

3 d bei 25°C auf Staib-Agarplatten sowie Reisextrakt-Platten kultiviert. Dabei konnte jedoch keine veränderte Fähigkeit der Deletionsmutanten in der Chlamydosporenbildung gefunden werden. In beiden Medien wuchsen die Mutanten wie der *C. dubliniensis* Wildtyp Wü284. In Abbildung 27 ist das Wachstum des *C. dubliniensis* Wildtyps sowie der Deletionsmutante CdCSR1M4 in Staib-Medium dargestellt.

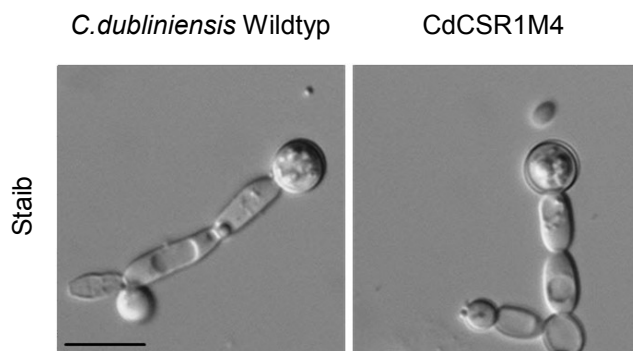


Abb. 27: Mikroskopische Aufnahme des *C. dubliniensis* Wildtyps Wü284 und der Deletionsmutante CdCSR1M4 nach 28-stündigem Wachstum in Staib-Medium bei 25°C. Maßstabsbalken: 10 µm.

3.10.2 Wachstum unter zinklimitierten Bedingungen

Mittels Plattentropftest wurde die Wachstumsfähigkeit der Deletionsmutante CdCSR1M4 und deren Komplementante CdCSR1K2 im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen SC5314 (*C. albicans*) und Wü284 (*C. dubliniensis*) unter zinklimitierten Bedingungen untersucht. Dafür wurden Festmedien verwendet, die mit verschiedenen Zusätzen supplementiert wurden. Die Platten wurden schließlich bei 25°C (Staib-Platten) oder 30°C (SD-Platten) für 2 Tage inkubiert. In Tabelle 17 sind die ausgewählten Medien und deren Zusätze sowie die jeweils getesteten Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 17: Verwendete Medien und Zusätze Plattentropftest.

Substanz/Konzentration	Medium
<u>EDTA</u> 0,5 mM	SD-, Staib-Agarplatten
<u>Zinkchlorid (ZnCl₂)</u> 100 µM; 1, 2 mM	SD-, Staib-Agarplatten
<u>Kalziumchlorid (CaCl₂)</u> 100 µM; 1, 2 mM	SD-, Staib-Agarplatten
<u>Magnesiumchlorid (MgCl₂)</u> 100 µM; 1, 2 mM	SD-, Staib-Agarplatten
<u>Kupferchlorid (CuCl₂)</u> 100 µM; 1, 2 mM	SD-, Staib-Agarplatten

EDTA fungierte dabei als Komplexbildner, der mit den zugeführten Kationen stabile Komplexe bilden kann. Die Kombination von 100 μM ZnCl_2 + 1 mM EDTA ist in der Literatur als „low zinc“ bzw. 1 mM ZnCl_2 + 1 mM EDTA als „high zinc“ angegeben (Kim *et al.*, 2008). Bei ersten Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass die Zugabe von 1 mM EDTA bereits die Wachstumsfähigkeit des *C. dubliniensis* Wildtyps stark beeinträchtigte. Daher wurde EDTA in den folgenden Untersuchungen in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt. Zunächst wurde das phänotypische Wachstum der zu untersuchenden Stämme in Gegenwart der einzelnen Zusätze geprüft. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zugabe von 0,5 mM EDTA spezifisch das Wachstum der *Cdcsr1* Δ -Mutante vollständig hemmte. Die Komplementante hingegen wuchs wie die beiden Wildtyp-Stämme und zeigte keine Veränderung hinsichtlich des Wachstums nach Zugabe von EDTA. Die Supplementation des SD-Festmediums mit 100 μM ZnCl_2 bzw. CaCl_2 und 1 mM ZnCl_2 bzw. CaCl_2 zeigte dagegen keine Unterschiede in der Wachstumsfähigkeit zwischen den Wildtyp-Stämmen, der *Cdcsr1* Δ -Mutante und deren Komplementante (Abbildung 28).

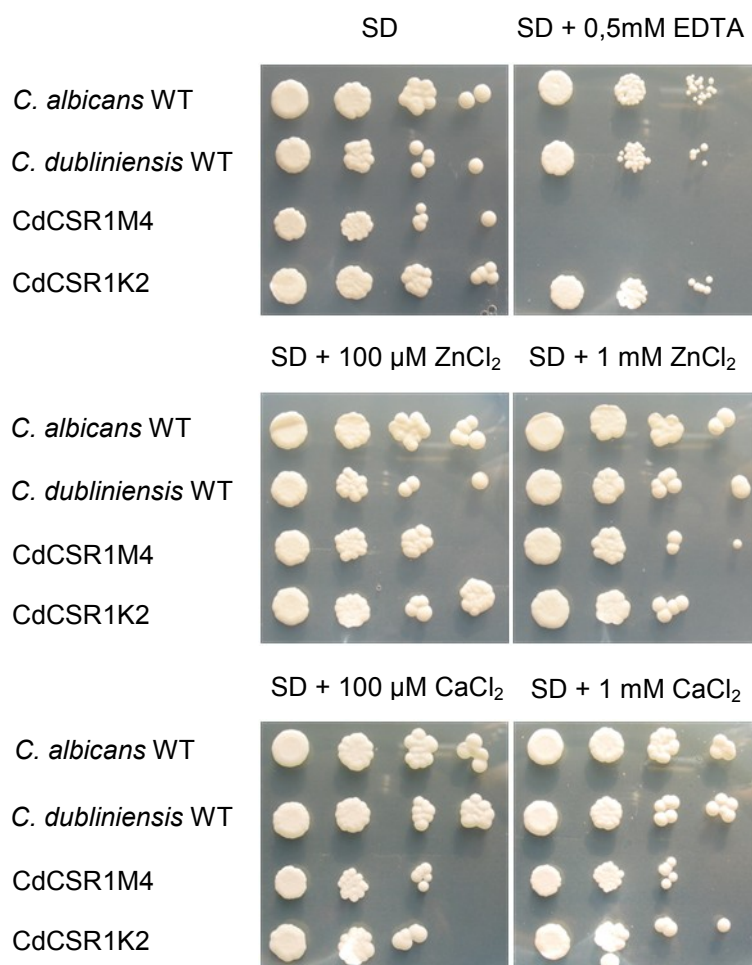


Abb. 28: Plattentropftest zur phänotypischen Analyse der Deletionsmutante *CdCSR1M4*. SD-Agar wurde mit 0,5 mM EDTA, 100 μM und 1 mM ZnCl_2 bzw. CaCl_2 supplementiert und die Platten 2 d bei 30°C kultiviert; (Wildtyp = WT).

Im nächsten Schritt wurden die Stämme unter den beschriebenen „low/high“ Zinkbedingungen getestet. Dabei zeigte sich, dass die Kombination von 0,5 mM EDTA + 100 μ M ZnCl₂ („low zinc“) ebenfalls vollständig das Wachstum der *Cdcsr1* Δ -Mutante hemmte. Die Komplementante wuchs auch in diesem Fall wie die beiden Wildtyp-Stämme und war nicht in ihrer Wachstumsfähigkeit beeinträchtigt. Durch Zugabe von 0,5 mM EDTA + 1 mM ZnCl₂ („high zinc“) bzw. 2 mM ZnCl₂ konnte dieser Wachstumsdefekt der Deletionsmutante CdCSR1M4 mit ansteigender Konzentration an Zink aufgehoben werden. Um zu überprüfen, ob wirklich der für *C. albicans* beschriebene Zinkmangel ursächlich für das gehemmte Wachstum der *Cdcsr1* Δ -Mutante ist, wurden zusätzlich weitere 2-wertige Kationen dem SD-Agar supplementiert (Tabelle 17). Wie in Abbildung 29 dargestellt, konnte die Zugabe von CaCl₂ den Wachstumsdefekt der Deletionsmutante CdCSR1M4 nicht aufheben. Eine Supplementation mit CuCl₂ und MgCl₂ zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten (Daten nicht gezeigt). Eine Deletion des Gens *CdCSR1* in *C. dubliniensis* führt also, wie bereits für die *csr1* Δ -Mutante in *C. albicans* beschrieben, zu einem Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen.

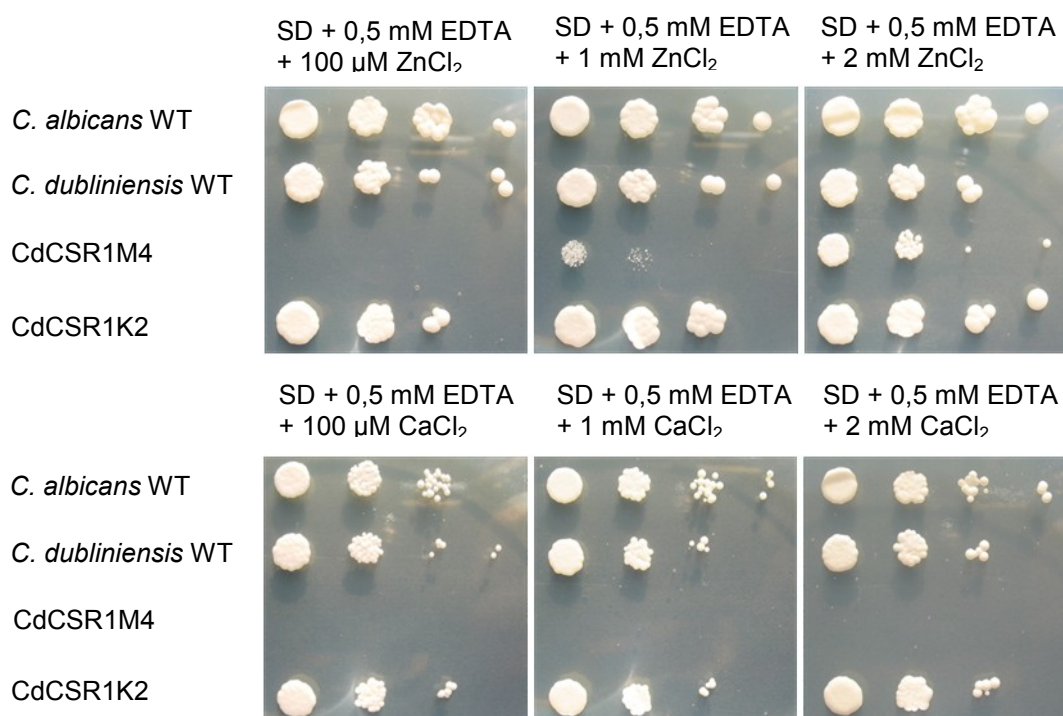


Abb. 29: Plattentropftest zur phänotypischen Analyse der Deletionsmutante CdCSR1M4 unter zinklimitierten Bedingungen. SD-Festmedium wurde mit 0,5 mM EDTA + 100 μ M / 1 mM ZnCl₂ bzw. CaCl₂ supplementiert und die Platten 2 d bei 30°C kultiviert; (Wildtyp = WT).

Unter **3.10.1** wurde bereits gezeigt, dass die *Cdcsr1Δ*-Mutante in der Lage ist Chlamydosporen auszubilden. In einer weiteren Untersuchung sollte nun überprüft werden, ob die Chlamydosporenausbildung unter zinklimitierten Bedingungen beeinträchtigt wird. Dafür wurde Staib-Festmedium mit den beschriebenen „low/high“ Zinkbedingungen- bzw. -konzentrationen supplementiert (Tabelle 17). Zunächst wurden auch hier die Zusätze isoliert auf deren Wirksamkeit auf die zu untersuchenden Stämme überprüft. Wie für die supplementierten SD-Agarplatten wurde das Wachstum der *Cdcsr1Δ*-Mutante durch die Zugabe von 0,5 mM EDTA zum Staib-Festmedium vollständig gehemmt. Die Supplementation mit 100 μ M ZnCl_2 bzw. CaCl_2 und 1 mM ZnCl_2 bzw. CaCl_2 zeigte keine Unterschiede in der Wachstumsfähigkeit zwischen den Wildtyp-Stämmen, der *Cdcsr1Δ*-Mutante und deren Komplementante, wie es auch für die SD-Platten der Fall war.

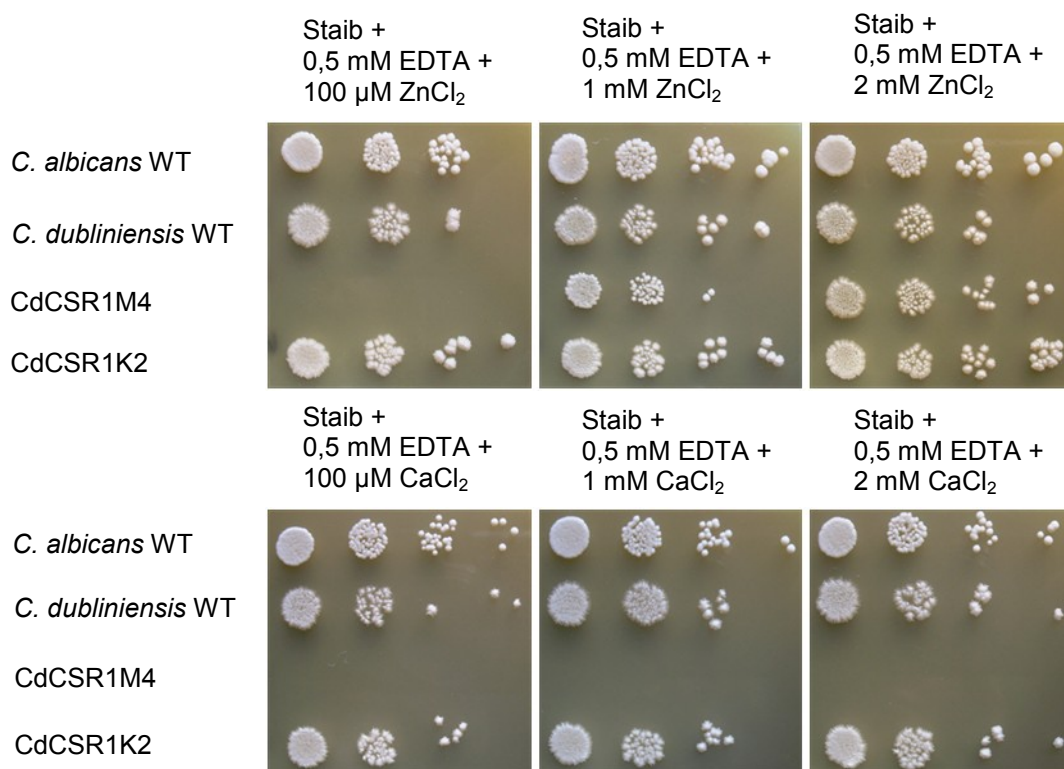


Abb. 30: Plattentropfstest zur phänotypischen Analyse der Deletionsmutante CdCSR1M4 unter zinklimitierten Bedingungen. Staib-Festmedium wurde mit 0,5 mM EDTA + 100 μ M / 1 mM ZnCl_2 bzw. CaCl_2 supplementiert und die Platten 2 d bei 25°C kultiviert; (Wildtyp = WT).

Die Zugabe von 0,5 mM EDTA + 100 μ M ZnCl_2 („low zinc“) hemmte ebenfalls vollständig das Wachstum der *Cdcsr1Δ*-Mutante, wobei die Komplementante CdCSR1K2 und die Wildtyp-Stämme SC5314 und Wü284 nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt

wurden. Mit steigender Konzentration an Zink konnte der Wachstumsdefekt der Deletionsmutante CdCSR1M4 auch im Staib-Festmedium aufgehoben werden (Abbildung 30). Zudem hatten die unterschiedlichen Konzentrationen an Zink in den Staib-Platten keinerlei Einfluss auf die Chlamydosporenbildung.

3.10.3 Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen

Es ist bekannt, dass sich *C. albicans* und *C. dubliniensis* bei erhöhtem pH-Wert in der Lage sind, innerhalb weniger Stunden Keimschläuche zu bilden. Deshalb wurde diese Bedingung zur Überprüfung des filamentösen Wachstums von *C. dubliniensis* und der Deletionsmutante CdCSR1M4 gewählt. Dafür wurden die zu untersuchenden Stämme über Nacht in flüssigem M199-Medium (pH4) bei 30°C kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in M199-Medium mit pH 8 überimpft und bei 37°C für 1-6 h geschüttelt. Des Weiteren kann die Hyphenbildung mittels fetalem Kälberserum (FCS-fetal calf serum; Tabelle 5) in beiden *Candida*-Spezies induziert werden. Daher wurden die zu testenden Stämme ebenfalls über Nacht in flüssigem YPD-Medium angezogen und anschließend in destilliertem Wasser mit 10% FCS bei 37°C für 1-6 h inkubiert.

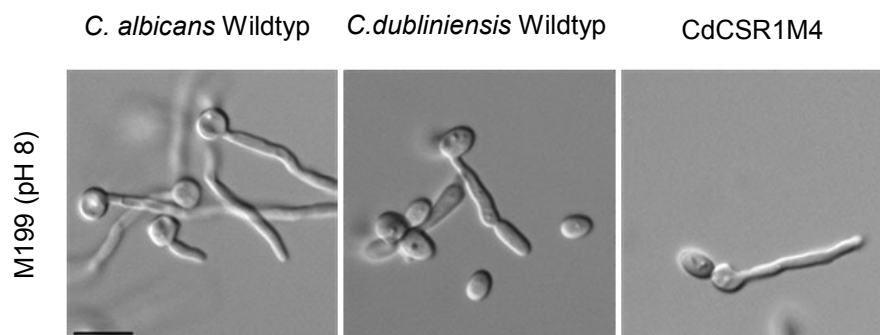


Abb. 31: Mikroskopische Aufnahme des *C. albicans* Wildtyps SC5314, des *C. dubliniensis* Wildtyps Wü284 und der Deletionsmutante CdCSR1M4 nach 4-stündigem Wachstum in M199-Medium (pH 8) bei 25°C. Maßstabsbalken: 10 µm

Für beide hypheninduzierenden Bedingungen konnten jedoch keine Unterschiede zwischen dem *C. dubliniensis* Wildtyp und der Deletionsmutante CdCSR1M4 hinsichtlich der Keimschlauchbildung gefunden werden. Wie in Abbildung 31 dargestellt, bildeten nach 4-stündigem Wachstum der Stämme in M199-Medium (pH 8) sowohl die wildtypischen Stämme SC5314 und Wü284, als auch die *Cdcsr1Δ*-Mutante Keimschläuche aus. Die

Inkubation der Stämme in destilliertem Wasser mit 10% FCS zeigte dasselbe Ergebnis. Eine Deletion des Gens *CdCSR1* in *C. dubliniensis* führt nicht wie in *C. albicans* unter hypheninduzierenden Bedingungen zu einem Defekt im filamentösen Wachstum.

3.11 Phänotypische Analyse der weiteren hergestellten Deletionsmutanten und der Überexpressionsstämme

Für die weiteren ausgewählten *C. dubliniensis* Gene *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*) und *CD36_34590* (*CdSUC1*) sowie für das *C. albicans* Gen *IME* wurden wie unter 3.8 beschrieben Deletionsmutanten hergestellt. Für die *C. albicans* Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845* wurden Überexpressionsstämme hergestellt.

In den ersten phänotypischen Analysen sollte zunächst überprüft werden, ob die ausgewählten Gene bei der Chlamydosporenbildung eine Rolle spielen, d. h. für die Deletionsmutanten, ob der Funktionsverlust eines dieser Gene bereits zu einer gestörten Ausbildung dieser morphologischen Struktur führt. Für die hergestellten Überexpressionsstämme stellte sich die Frage, ob eine verstärkte Expression dieser Gene einen Einfluss auf die Ausbildung bzw. Entwicklung der Chlamydosporen bzw. Filamentierung haben könnte. Zunächst wurden dafür alle hergestellten Deletionsmutanten für 28 h bei 25°C in Staib-Medium kultiviert. Zudem wurden alle Stämme auf Reisextrakt-Platten und auf Staib-Agarplatten ausgestrichen und für 2-3 d bei 25°C inkubiert. Die Überexpressionstämme wurden auf Reisextrakt-Platten bei 25°C für 2-3 d kultiviert. Bei der Auswertung zeigte sich, dass keine der Deletionsmutanten die Fähigkeit zur Chlamydosporenbildung verloren hatte bzw. keine der Überexpressionstransformanten eine verstärkte Chlamydosporenentwicklung aufwies. Es konnte kein phänotypischer Unterschied im Vergleich zum *C. dubliniensis* Wildtyp bzw. *C. albicans* Wildtyp festgestellt werden. Ebenfalls konnten keine Veränderungen im filamentösen Wachstum sowohl der Überexpressionsstämme als auch der Deletionsmutanten im Vergleich zu den wildtypischen Stämmen festgestellt werden. Für alle hypheninduzierenden Bedingungen bildeten die Mutanten in gleichem Maße Keimschläuche aus wie der *C. albicans* Wildtyp bzw. *C. dubliniensis* Wildtyp.

In weiteren Untersuchungen sollte nun überprüft werden, ob die hergestellten Deletionsmutanten und Überexpressionsstämme unter nicht chlamydosporeninduzierenden

Bedingungen phänotypische Unterschiede im Vergleich zum entsprechenden wildtypischen Stamm aufzeigten. Dafür wurde mittels Plattentropftest die Wachstumsfähigkeit der Mutanten im Vergleich zum *C. dubliniensis*- bzw. *C. albicans* Wildtyp bezüglich unterschiedlicher Zusätze untersucht

Tabelle 18: Verwendete Medien und Zusätze der Plattentropftests.

Agar	Bedingung
<u>für alle hergestellten Überexpressionsmutanten:</u>	
YPD-Agar	30°C, 42°C
Reisextrakt-Agar	25°C
Kochblut-Agar	37°C +/- 5% CO ₂
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	YPD-Agarplatten: 2; 5; 10 mM SD-Agarplatten: 0,5; 1 mM
Hypheninduktion: 10% FCS; DMEM	37°C; 1-6 h
<u>für alle hergestellten Deletionsmutanten:</u>	
YPD-, SD-Agar	30°C; 37°C, 42°C
Staib-, Reisextrakt-Agar	25°C; 30°C
Kartoffel-Agar	30°C
Kochblut-Agar	37°C +/- 5% CO ₂
Hypheninduktion: pH-Shift	37°C; 1-6 h
Substanz	Medium/Konzentration
<u>für <i>Cd54540Δ</i>, <i>CdSUC1Δ</i>:</u>	
Glucose	YPD-, SD-Agarplatten: 0,1; 2; 4%
Maltose	YPD-, SD-Agarplatten: 0,1; 2; 4%
Saccharose	YPD-, SD-Agarplatten: 0,1; 2; 4%
Trehalose	YPD-, SD-Agarplatten: 0,1; 2; 4%
<u>für <i>Cd06420Δ</i>, <i>Cd15800Δ</i>, <i>Cd19040Δ</i>, <i>Cd23160Δ</i>, <i>Cd31810Δ</i>, <i>Cd54540Δ</i>, <i>Cd80940Δ</i>, <i>Cd873800Δ</i>, <i>CdIME2Δ</i>, <i>CdPOX18Δ</i>, <i>CdSUC1Δ</i>, <i>IME2Δ</i>:</u>	
Calcofluor White (CW)	YPD-, Staib-Agarplatten: 25; 50; 100; 250; 500 µg/ml SD-Agarplatten: 1; 5; 7,5; 10 µg/ml
Fluconazol	YPD-, Staib-Agarplatten: 0,25; 0,5; 1; 2,5 µg/ml
Natriumchlorid (NaCl)	YPD-, Staib-Agarplatten: 0,25; 0,5; 0,75; 1 M
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	YPD-, Staib-Agarplatten: 1; 2; 4 mM SD-Agarplatten: 0,5; 0,75; 1,25 mM

In Tabelle 18 sind alle getesteten Bedingungen, die ausgewählten Medien und deren Zusätze, sowie die jeweils getesteten Konzentrationen aufgelistet. Die Festmedien wurden mit den verschiedenen Zusätzen supplementiert und die Platten (wenn nicht anders angegeben) bei 30°C für 2 d inkubiert. Bei keiner der getesteten Bedingungen bzw. Substanzen konnte ein phänotypischer Unterschied zwischen den hergestellten Deletionsmutanten bzw. Überexpressionsstämmen und dem entsprechenden wildtypischen Stamm festgestellt werden. Die Wachstumsfähigkeit der einzelnen Mutanten war jeweils vergleichbar mit dem des wildtypischen Stammes.

4 Diskussion

C. albicans und *C. dubliniensis* sind pathogene Hefepilze, die neben ihrer engen phylogenetischen Verwandtschaft Unterschiede in der Epidemiologie, Pathogenität und einigen phänotypischen Eigenschaften aufweisen. Mit einer genauen phänotypischen und genotypischen Untersuchung einer Reihe von atypischen *C. albicans*-Isolaten erfolgte 1995 erstmals die Beschreibung von *C. dubliniensis* als eigenständige Spezies (Sullivan *et al.*, 1995). *C. dubliniensis* ist bis heute, neben *C. albicans*, der einzige Vertreter im Genus *Candida*, der in der Lage ist Keimschläuche und Chlamydosporen zu bilden. Mit der Beobachtung einer spezies-spezifischen Filamentierung und Chlamydosporenbildung von *C. dubliniensis* auf Staib-Agar (*Guizotia abyssinica* Kreatinin-Agar), gelang es Staib und Morschhäuser erstmals, eine Methode zur verlässlichen phänotypischen Differenzierung zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* zu beschreiben (Staib *et al.*, 1999). Auf diesem Agar formt *C. dubliniensis* raue Kolonien mit zahlreichen Chlamydosporen und wächst filamentös, wohingegen *C. albicans* glatte Kolonien produziert (Staib, 1962; Staib und Morschhäuser, 1999; Staib und Arasteh, 2001). Die Chlamydospore hat somit eine wichtige Rolle für die Speziesidentifizierung in der Diagnostik, wenngleich man bisher ihre biologische Funktion nicht kennt. Eine Identifizierung von Signalwegen und regulatorischen Faktoren, die die Chlamydosporenbildung beeinflussen, ist daher unabdingbar, um weitere funktionelle und genetische Kenntnisse über die morphologische Struktur der Chlamydospore zu erlangen. In den letzten Jahren konnten bereits einige Gene in *C. albicans* identifiziert werden, die für die Entwicklung von Chlamydosporen notwendig sind. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, Proteine zu identifizieren, die spezifisch für Chlamydosporen sind und somit als Marker fungieren könnten. Mit Hilfe solcher Marker könnte eine Differenzierung zwischen Chlamydosporen und anderen morphologischen Wuchsformen erheblich erleichtert werden. Außerdem wären sie für weitere Untersuchungen hinsichtlich der morphogenetischen Entwicklung der Chlamydospore hilfreich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals ein globales Transkriptionsprofil unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen erstellt. Ziel war es, neue Einblicke in die Genregulation von *C. albicans* und *C. dubliniensis* während der Entwicklung von Chlamydosporen zu bekommen und mögliche spezifische Marker zu identifizieren.

4.1 Identifizierung von chlamydosporenspezifischen Genen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* mittels RNA-Sequenzierung

Da der Transkriptionsfaktor Nrg1 als Repressor der Chlamydosporenbildung bekannt bzw. für die spezie-spezifische Ausbildung der Chlamydosporen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* verantwortlich ist, war die *C. albicans nrg1Δ*-Mutante neben den Wildtyp-Stämmen von *C. albicans* und *C. dubliniensis* ebenfalls Bestandteil der Analysen dieser Arbeit. So wurde im ersten Teil der Arbeit mit Hilfe von RNA-Sequenzierung ein Genexpressionsprofil der Wildtypen *C. albicans* und *C. dubliniensis* sowie der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante während des Wachstums in Staib-Medium erstellt. Sowohl die differentiell exprimierten Gene der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und des *C. dubliniensis* Wildtyps wurden mit dem *C. albicans* Wildtyp verglichen und schließlich ein Set von putativ chlamydosporenspezifischen Genen erstellt. Dabei konnten zum einen Gene identifiziert werden, die für Proteine mit noch unbekannter Funktion bzw. für uncharakterisierte oder hypothetische Proteine kodieren. Da man bisher wenige Gene kennt, die für die Entwicklung von Chlamydosporen nötig sind, überraschte dieses Ergebnis nicht. Es unterstreicht vielmehr die Annahme, dass die Entwicklung von Chlamydosporen mit einer hohen Spezifität einhergeht. Zum anderen war besonders auffällig, dass eine Vielzahl der herauf regulierten Gene für Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine kodieren. Auf diese wird unter 4.1.1 detailliert eingegangen.

Neben der Chlamydosporenbildung spielt Nrg1 auch eine wichtige Rolle während der Filamentierung. Daher war es ebenfalls nicht überraschend, dass unter den putativ chlamydosporenspezifischen Genen, sich auch solche befanden, die bereits als putatives Zielgen von Nrg1 bekannt waren und/oder im Zusammenhang mit Filamentierung stehen. Dazu gehören beispielsweise *HWPI* sowie *PGA13*, *PGA55* und *IHD1*, die für Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine kodieren (de Groot *et al.*, 2003; Klis *et al.*, 2009). Als weitere Zielgene sind das stark herauf regulierte Gene *orf19.6741*, mit bisher noch unbekannter Funktion, und *UME6* zu nennen. *UME6* wurde im *C. dubliniensis* Wildtyp und in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante verglichen mit dem *C. albicans* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium herauf reguliert. In *C. albicans* ist *UME6* bereits als ein spezifischer Regulator der Filamentierung bekannt (Banerjee *et al.*, 2008; Zeidler *et al.*, 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Filamentierung in *C. albicans* und *C. dubliniensis* durch die differentielle Expression von *UME6* beeinflusst wird (O'Connor *et al.*, 2010). Weiterhin ist *UME6* eine wichtige downstream-Komponente des Nrg1-Tup1 Signalweges während des filamentösen

Wachstums. Es wird angenommen, dass Nrg1 und Ume6 über einen negativen Feedbackmechanismus wirken, und so die Induktion, das Level und die Dauer der Expression hyphenspezifischer Gene bezüglich verschiedener induzierender Bedingungen kontrollieren (Banerjee *et al.*, 2008). Unter hypheninduzierenden Bedingungen ist die Expression von *NRG1* herunter reguliert, was zu einem Anstieg des *UME6*-Levels führt (Banerjee *et al.*, 2008). Während des Wachstums von *C. dubliniensis* in Staib-Medium war die Expression von *NRG1* ebenfalls herunter reguliert und würde die erhöhte Expression von *UME6* unter dieser Bedingung erklären. Ebenfalls könnte es sein, dass *NRG1* und *UME6* unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen in ähnlicher Weise Zusammenwirken, wie es unter hypheninduzierenden Bedingungen der Fall ist.

Da der Dimorphismus bzw. die Hyphenbildung von *C. albicans* einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt und mit Nrg1 ein bedeutender Repressor der Filamentierung bekannt ist, verwundert es nicht, dass Transkriptionsanalysen der letzten Jahre häufig sowohl vom *C. albicans* Wildtyp sowie der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante erstellt wurden. Beispielsweise beschäftigten sich Kadosh und Johnson in ihren Untersuchungen mit dem morphologischen Wechsel von Hefe zu Hyphe. Dafür verwendeten sie u. a. die *nrg1Δ*-Mutante um Transkriptionsprofile sowohl unter nicht-hypheninduzierenden Bedingungen als auch unter hypheninduzierenden Bedingungen zu erstellen (Kadosh und Johnson, 2005). Sie identifizierten dabei Gene wie *HWPI*, *IHD1* und *PGA55*, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit während des Wachstums in Staib-Medium gefunden wurden. Wichtig bleibt dabei jedoch zu sagen, dass man die verschiedenen Transkriptionsanalysen- bzw. profile nicht direkt miteinander vergleichen kann. Gewisse Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten liegen aufgrund der teilweise gleichen verwendeten Stämme ebenso nah, wie Unterschiede zu anderen Profilen. Ein globales Genexpressionsprofil unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen (Staib-Medium, 25°C) wurde mit der vorliegenden Arbeit erstmals erstellt. Daher ist die Identifizierung von Genen innerhalb dieser Arbeit, die mit anderen Transkriptionsprofilen bisher nicht erfasst wurden sowie die Vielzahl an identifizierten Genen, die für Proteine mit noch unbekannter Funktion kodieren, nicht überraschend. Zudem verwundert es nicht, dass Zielgene von Nrg1 sowohl unter hyphenspezifischen Bedingungen als auch unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen herauf reguliert werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Chlamydosporenproduktion in *C. albicans* mit dem Wachstum von Myzel einhergeht und unter dem Einfluss von Regulatoren (Nrg1) der Hyphenbildung steht, stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob filamentöses Wachstum eine Voraussetzung für die Entwicklung von Chlamydosporen darstellt. Um zu überprüfen, ob beide morphogenetischen Programme unabhängig voneinander ablaufen, sind Bedingungen erforderlich, bei denen Chlamydosporen ohne filamentöse Zellen gebildet werden. Beispielsweise veröffentlichten Torosantucci und Cassone bereits 1983 dazu Untersuchungen, in denen sie zeigten, dass die Chlamydosporenbildung nicht zwangsläufig mit der Entwicklung von Hyphen einhergeht (Torosantucci und Cassone; 1983). Sie beobachteten, dass die Entwicklung von Chlamydosporen durch N-Acetylhexosamin, speziell N-Acetyl-D-Glucosamin, induziert werden kann. Eine weitere interessante Beobachtung wurde bei der Verwendung von Natrium-Taurocholat gemacht. Bereits Anfang der 1960er Jahre wurde Taurocholat-Agar (Salz der Taurocholsäure) zur Chlamydosporeninduktion in *C. albicans* bzw. zu dessen Identifizierung genutzt (Raubitschek, 1958; Bakerspigel 1962). Bakerspigel und Burke zeigten, dass in Flüssigmedium mit 1% Natrium-Taurocholat, Chlamydosporen direkt aus Blastosporen gebildet werden können (Bakerspigel und Burke, 1974). Auch Staib und Morschhäuser fanden in *C. dubliniensis* eine Chlamydosporenentwicklung ohne filamentöses Wachstum (unveröffentlichte Daten, Staib und Morschhäuser, 2007).

Martin *et al.* beschreiben die morphogenetische Entwicklung von Hyphe und Chlamydospore ebenfalls als voneinander unabhängige Prozesse, da nicht alle Gene, welche die Hyphenbildung beeinflussen auch für die Entwicklung von Chlamydosporen nötig sind und einige Gene zudem einen unterschiedlichen Effekt haben (Martin *et al.*, 2005). Der Transkriptionsfaktor Efg1 beispielsweise ist für die Induktion des Hyphenwachstums bei 37°C wichtig, jedoch nicht für filamentöses Wachstum unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen (Sonneborn *et al.*, 1999; Giusani *et al.*, 2002). Die *efg1Δ*-Mutante wächst unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen hyperfilamentös, ist allerdings nicht in der Lage Chlamydosporen zu bilden (Sonneborn *et al.*, 1999). Des Weiteren konnten Martin *et al.* zeigen, dass sich die Kernteilungszyklen sowie die Lokalisation der Septen von Chlamydosporen-tragenden Hyphen von echten Hyphen unterscheiden. Als Erklärung dafür wird vermutet, dass sich Filamente, die Chlamydosporen tragen, von echten Hyphen unterscheiden und die Chlamydosporenentwicklung anderen Regulationsmechanismen unterliegt, als die der Hyphenbildung (Martin *et al.*, 2005). Zudem zeigten sie, dass Farnesol die Filamentierung

bei 37°C auf Reisextrakt-Agar in einer ähnlichen Form wie das Hyphenwachstum bei 37°C hemmt (Hornby *et al.*, 2003). Außerdem erhöhte die Zugabe von Farnesol die Anzahl an Chlamydosporen pro Filament, aber nicht die Stärke der Filamentierung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls beobachtet werden, dass Farnesol keinen Einfluss auf die Chlamydosporenentwicklung hatte, jedoch zu einer Verkürzung der Hyphen in Staib-Medium führte (Daten nicht gezeigt).

Alle diese beschriebenen Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass Hyphenwachstum nicht zwangsläufig eine Voraussetzung für die Entwicklung von Chlamydosporen darstellt. Speziell die Erklärung von Martin *et al.*, dass beide Prozesse unabhängig voneinander zu betrachten sind, würde mit den Expressionsdaten dieser Arbeit zusammenpassen, denn während des Wachstums in Staib-Medium wurden zum einen eine Vielzahl an Genen identifiziert, die für Proteine mit noch unbekannter Funktion bzw. für uncharakterisierte oder hypothetische Proteine kodieren. Zum anderen wurde das Profil nicht von hyphenspezifischen Genen sondern von Genen, die für Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine kodieren, dominiert.

Auf der anderen Seite weiß man jedoch, dass die Chlamydosporenbildung auch von Genen beeinflusst wird, die die Hyphenentwicklung kontrollieren (Nobile *et al.*, 2003). Die Gene *SUV3* und *SCH9* sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Mutantenstämme mit Insertionen in diesen Genen waren weder in der Lage Chlamydosporen noch Hyphen auszubilden (Nobile *et al.*, 2003). In der Untersuchung dieser Arbeit wurden die Gene allerdings lediglich als schwach herab reguliert gefunden und waren nicht unter den möglichen chlamydosporenspezifischen Genen verzeichnet. Eine denkbare Erklärung dafür könnte der Zeitpunkt der Transkriptionsanalyse dieser Arbeit sein. Möglicherweise sind *SUV3* und *SCH9* für die Induktion der Chlamydosporenentwicklung von Bedeutung und spielen daher besonders in der Anfangsphase der Bildung eine Rolle. Zu einem späteren Zeitpunkt, als nach 28 h, könnte ihre Expression niedrig oder bereits herunter reguliert sein. Ebenfalls könnte das verwendete Medium eine Rolle spielen. In der Publikation von Nobile *et al.* wurde Reisextrakt verwendet. Eventuell würde eine Genexpressionsanalyse während des Wachstums auf diesem chlamydosporeninduzierenden Agar eine andere Regulation der Gene *SUV3* und *SCH9* zeigen.

4.1.1 Lokalisation chlamydosporenspezifischer Gene

Unter den differentiell am stärksten exprimierten Genen der *C. albicans* *nrg1*Δ-Mutante und dem *C. dubliniensis* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium konnten neben den bereits genannten Zielgenen von Nrg1 bzw. hyphenassoziierten Genen, eine Vielzahl an Genen identifiziert werden, die für Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierte Proteine kodieren. Zu den dabei bereits bekannten gehören unter anderem *PGA13* und *PGA55*. Des Weiteren sind die vier am stärksten herauf regulierten, putativ chlamydosporenspezifischen Gene der *C. albicans* *nrg1*Δ-Mutante und deren Homologe in *C. dubliniensis* zu nennen (*orf19.3512/CD36_30750*; *orf19.654/CD36_30570*; *orf19.4170/CD36_40770*; *orf19.4463/CD36_03620*). Diese Gene sind in *C. dubliniensis* als putative Zellwandgene verzeichnet, in *C. albicans* hingegen als uncharakterisiert beschrieben und wiesen hohe Übereinstimmungen in ihren DNA-Sequenzen auf. Darüber hinaus lag die Vermutung nahe, dass aufgrund der spezifischen Expression dieser Gene während des Wachstums in Staib-Medium und dem Wissen, dass lediglich *C. dubliniensis* und *C. albicans* in der Lage sind Chlamydosporen zu bilden, diese Gene für beide *Candida*-Arten spezifisch sein könnten. Mit einer Sequenzanalyse konnte dies dahingehend bestätigt werden, dass die identifizierten putativen chlamydosporenspezifischen *C. albicans* und *C. dubliniensis* Gene nicht weit verteilt in der Gattung *Candida* auftreten. Diese Beobachtung bekräftigt eine eventuell spezifische Rolle dieser Gene während der Chlamydosporenentwicklung in *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Zudem wurde mit dem verstärkten Auftreten mutmaßlicher Zellwandgene innerhalb der Gruppe von möglichen chlamydosporenspezifischen Genen, die Annahme unterstützt, dass die Zellwand von Chlamydosporen eine spezifische und charakteristische Zusammensetzung aufweist, wie es auch für die Zellwand von Hyphen und Hefezellen der Fall ist. Deren Aufbau bzw. die Zusammensetzung ist in *C. albicans* während der Morphogenese Veränderungen ausgesetzt (Kapteyn *et al.*, 2000; Valentin *et al.*, 2000). Verschiedene Transkriptomanalysen konnten zeigen, dass es besonders bei der Transition von Hefezelle zu Hyphe zu zahlreichen Änderungen in der Expression von Genen kommt, die für Proteine kodieren, welche sowohl in intrazelluläre Prozesse als auch in die Zusammensetzung der Zelloberfläche involviert sind (Nantel *et al.*, 2002; Sohn *et al.*, 2003; Kadosh und Johnson, 2005). Die Hyphenzellwand in *C. albicans* unterscheidet sich dabei von der Zellwand einer Hefezelle bezüglich spezifischer Proteine, wie Ece1, Hwp1 und Als3. Diese Proteine sind für *C. albicans* wichtig, um an lebende und nicht-lebende

Oberflächen zu adhären. So vermitteln sie die Zell-Zell-Adhäsion während der Biofilmbildung und sind für die Interaktion von *C. albicans* mit Endothelzellen von Bedeutung. Aufgrund des erhaltenen, charakteristischen Genexpressionsprofils unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen und mit dem Ziel, im Rahmen dieser Arbeit mögliche chlamydosporenspezifische Marker zu identifizieren, wurden schließlich zwei der am höchsten exprimierten putativen Zellwandgene ausgewählt. Das waren *CD36_30750/CD36_40770* und deren *C. albicans* Homologe *orf19.3512/orf19.4170*. Diese Gene wurden aufgrund der im Verlauf dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse als „Chlamydosporenspezifisches-Protein 1 und 2“, *Ca/CdCSP1* und *Ca/CdCSP2* bezeichnet. Mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR konnte zunächst die starke Expression der beiden putativen Zellwandgene *CdCSP1* und *CdCSP2* im *C. dubliniensis* Wildtyp bestätigt werden. Hier waren *CdCSP1* und *CdCSP2* im *C. dubliniensis* Wildtyp, während des Wachstums in Staib-Medium im Vergleich zum Wachstum in YPD-Medium, über das 1000-fache herauf reguliert. Die *C. albicans* Homologe *CaCSP1* und *CaCSP2* waren in der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante verglichen mit dem *C. albicans* Wildtyp ebenfalls signifikant herauf reguliert. Obwohl *C. albicans* nicht in der Lage ist in Staib-Medium Chlamydosporen zu bilden, wurde mit quantitativer Real-Time-RT-PCR eine schwache Expression der Gene *CaCSP1* und *CaCSP2* jedoch auch im wildtypischen *C. albicans*-Stamm in diesem Medium verzeichnet. Eine Inkubation der hergestellten GFP-Reporterstämme dieser Gene in Staib-Medium zeigte hingegen keinerlei Fluoreszenz der (Hefe)Zellen, was erklären würde, warum die Expression der Gene deutlich vermindert war. Eine weitere Erklärung dafür könnte sein, dass diese Gene spezifisch für Chlamydosporen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* sind und das, wenngleich *C. albicans* unter der getesteten Bedingung keine Chlamydosporen bildet, generell dazu befähigt ist. Somit könnte es eine schwache Basalexpression der Gene sein, die auch in Staib-Medium gegenüber YPD-Medium existiert. Aufgrund der Repressorwirkung von *NRG1* wird die Chlamydosporenbildung im *C. albicans* Wildtyp während des Wachstums in Staib-Medium jedoch verhindert und die Gene *CaCSP1/2* werden nicht stärker exprimiert. In der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante entfällt dieser reprimierende Effekt von *NRG1*, die Deletionsmutante bildet Chlamydosporen aus und die Gene *CaCSP1* und *CaCSP2* sind in Staib-Medium stärker herauf reguliert.

Um die zwei ausgewählten *C. albicans* und *C. dubliniensis* Gene einer morphologischen Struktur zuzuordnen bzw. deren exakte Lokalisation in der Zelle zu bestimmen, wurden in einem nächsten Schritt GFP-Reporterstämme für diese Gene hergestellt. Dafür wurden

DNA-Kassetten für Translationsfusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konstruiert und in eines der entsprechenden Allele der Zielgene im *C. dubliniensis*- bzw. *C. albicans*-Wildtyp integriert. Mit Hilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie konnte schließlich sowohl für die zwei *C. dubliniensis* Gene, als auch für deren Homologe in *C. albicans* bzw. die jeweils kodierten Proteine, eine Lokalisation in der Zellwand von Chlamydosporen festgestellt werden. Die damit verbundene erhöhte Fluoreszenz wurde dabei weder in Hefezellen, Pseudohyphen noch in der Suspensorzelle lokalisiert. Die *C. dubliniensis* Proteine *Cdcsp1/2* konnten zudem sowohl in der Zellwand von Chlamydosporen, die sich auf Staib-Agar bzw. in Staib-Medium entwickelt hatten, als auch in solchen, die auf Reisextrakt-Agar gewachsen waren, lokalisiert werden. Die für die *C. albicans* Gene *CaCSP1/2* hergestellten GFP-Reporterstämme wurden neben Reisextrakt-Agar ebenfalls auf Staib-Agar bzw. in Staib-Medium kultiviert, wobei, wie bereits erwähnt, dort keinerlei Fluoreszenz der Hefezellen detektiert werden konnte. Da *C. albicans* unter dieser Bedingung keine Chlamydosporen entwickeln kann, untermauert dieses Ergebnis die Annahme, dass die Produkte der Gene *CdCSP1/CaCSP1* und *CdCSP2/CaCSP2* spezifisch für Chlamydosporen sind.

Um das spezifische Vorkommen der identifizierten Proteine in Chlamydosporen weiter zu unterstützen, könnten in nächsten Untersuchungen andere chlamydosporeninduzierende Bedingungen getestet werden. Dabei wären beispielsweise Medien zur Chlamydosporeninduktion in *C. albicans*, wie Taurocholat-Agar sowie DRBC-Agar für eine Induktion in *C. dubliniensis* zu nennen. Auf beiden Medien müssten die entsprechenden *C. albicans* bzw. *C. dubliniensis* GFP-Reporterstämme Chlamydosporen bilden. Um eine mediumabhängige Spezifität der Proteine auszuschließen, sollte die Lokalisation der Proteine *CdCSP1/CaCSP1* und *CdCSP2/CaCSP2* in der Chlamydosporenzellwand auch unter diesen induzierenden Bedingungen möglich sein.

Mit den beschriebenen Ergebnissen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nun erstmals Gene identifiziert werden, die zum einen spezifisch für Chlamydosporen sind. Zum anderen konnte mit der Lokalisation in der Zellwand ein erster Hinweis hinsichtlich einer möglichen Funktion der Proteine innerhalb der Zelle gegeben werden. Da man bisher weder die genetische Regulation noch die biologische Funktion der Chlamydospore im Lebenszyklus von *C. albicans* bzw. *C. dubliniensis* kennt, ist eine solche Identifizierung und Charakterisierung neuer Gene von großer Bedeutung. Dabei wäre es für zukünftige Untersuchungen interessant zu sehen, ob chlamydosporenspezifische Gene auch unter anderen (nicht-chlamydosporenspezifischen) Bedingungen induziert werden. Ebenfalls

wäre es aufschlussreich zu erfahren, über welchen Zeitraum diese Gene exprimiert werden. Spielen sie eine Rolle während der Induktion der Chlamydosporenbildung oder sind sie für die Aufrechterhaltung dieser Strukturen unerlässlich und werden erst nach Ausbildung einer Chlamydospore exprimiert? Solche Informationen könnten schließlich konkretere Hinweise bezüglich der Funktion dieser identifizierten Gene liefern und möglicherweise somit auch für die der Chlamydospore. Darüber hinaus könnten die Gene als Marker zum Einsatz kommen bzw. könnten die hergestellten GFP-Reporterstämme als nützliches molekularbiologisches Werkzeug zur Differenzierung zwischen Chlamydosporen und anderen morphologischen Strukturen in zukünftigen Untersuchungen Verwendung finden.

Um zu überprüfen, ob die Gene *CdCSP1/2* auch bei der Bildung von Chlamydosporen eine Rolle spielen, wurden in einem nächsten Schritt, mit Hilfe der SAT1-Flipper Technik, Deletionsmutanten dieser *C. dubliniensis* Gene hergestellt. Ferner wurden zahlreiche Untersuchungen zum Wachstum der Deletionsmutanten unter zellwandstressinduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dies hatte den Hintergrund, dass in zahlreichen älteren Publikationen die Rolle von Chlamydosporen als stress-resistente Dauerformen diskutiert wurde. Beispielsweise hieß es in einer Doktorarbeit von 1971, dass Chlamydosporen keine infektiösen Einheiten darstellen und eher, aufgrund ihres hohen Fettgehaltes, notwendig für das Überleben von *C. albicans* außerhalb des Körpers seien (Hendry, 1971; Bakerspiegel und Burke, 1974). Wenngleich diese Theorien bis heute nicht bestätigt werden konnten, so sollte dennoch in dieser Arbeit getestet werden, ob die hergestellten Mutanten unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen sensitiver gegen Zellwandstress sind.

Zunächst wurden die hergestellten Deletionsmutanten der Gene *CdCSP1/2* bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Chlamydosporen und Keimschläuchen überprüft. Dabei unterschied sich die Wachstumsfähigkeit der Deletionsmutanten weder unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen (25°C, Staib-Medium/Agar; Reisextrakt-Agar) noch unter hypheninduzierenden Bedingungen (pH-Shift) von der des *C. dubliniensis* Wildtyps. Dies lässt vermuten, dass die Gene *CdCSP1* und *CdCSP2* spezifisch für Chlamydosporen, jedoch nicht essentiell für deren Ausbildung sind. Zudem führte die Deletion eines der Gene nicht zu einer Störung in der Keimschlauchbildung. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der hohen Ähnlichkeit, welche die untersuchten Gene untereinander aufweisen, zu finden sein. Daher kann eine eventuelle Redundanz der kodierenden Proteine in Betracht gezogen werden. Was aber passiert bei der Deletion mehrerer dieser Gene? Eine Störung in der Chlamydosporenausbildung, in deren

Ausreifung oder auch ein genereller Wachstumsdefekt des Pilzes unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen wäre denkbar. Darüber hinaus ist die biologische Funktion von Chlamydosporen bis heute nicht bekannt, wodurch auch nicht die Möglichkeit besteht, funktionelle Tests durchzuführen. Die Deletionsmutanten waren noch in der Lage Chlamydosporen zu entwickeln, ob die gebildeten Chlamydosporen jedoch ihre Funktion noch ganzheitlich erfüllen, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht überprüfen. Weiterhin zeigten die verschiedenen, mittels Tropftest untersuchten, Zellwandstressoren keine Veränderung der Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer Wachstumsfähigkeit bzw. Chlamydosporenentwicklung verglichen mit dem wildtypischen Stamm Wü284. Auch hier kann als mögliche Erklärung die hohe Ähnlichkeit und eventuelle Redundanz der kodierenden Proteine genannt werden. Durch Deletion eines dieser Gene kommt es zu keiner verzögerten oder fehlerhaften Ausbildung von Chlamydosporen bzw. haben diverse Zellwandstressoren keinen negativen Einfluss, da der Funktionsverlust eines Genes durch die anderen aufgefangen werden kann. Auch in diesem Fall wäre die Herstellung von Mehrfachmutanten aufschlussreich. Möglicherweise könnten aufgrund des Fehlens mehrerer putativer Zellwandgene auch Stressoren der Zellwand diese leichter angreifen und schädigen bzw. in ihrer intakten Synthese stören. Für die Zukunft könnte die Konstruktion und phänotypische Analyse solcher Mehrfachmutantenstämme weitere Einblicke in die strukturelle und biologische Funktion von Chlamydosporen liefern. Zudem würde man auf diesem Weg die identifizierten Gene weiter charakterisieren und so ihre möglichen Aufgabe innerhalb der Zelle bestimmen.

Ebenfalls wäre es in zukünftigen Untersuchungen interessant, Homologe von *C. albicans* Zellwandgenen in *C. dubliniensis* hinsichtlich ihrer Funktion zu überprüfen. Wie bereits erwähnt, fehlen Gene wie *ALS3* oder *HYR1* im Genom von *C. dubliniensis* (Moran *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2009). Für *PGA13* existiert jedoch ein Homolog in *C. dubliniensis*, zudem wurde es unter den am stärksten exprimierten Genen während des Wachstums in Staib-Medium gefunden und somit als putativ chlamydosporenspezifisches Gen innerhalb dieser Arbeit identifiziert. In *C. albicans* ist *PGA13* zum einen für die Ausbildung von normalen Oberflächeneigenschaften der Zellwand von Bedeutung, zum anderen ist es in der Zellwandsynthese involviert (Gelís *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es durch den Austausch eines Teils der kodierenden Region von *PGA13*, zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Kongorot, Calcofluor White und Zymolase kommt. Die Deletion von *PGA13* führte zu einer verzögerten Filamentierung der Mutanten (Gelís *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Beobachtungen für *PGA13* in *C. albicans* wäre es aufschlussreich

zu sehen, welchen Effekt die Deletion des Homologs in *C. dubliniensis* hätte. Eventuell könnte hier ebenfalls eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Zellwandstressoren vorliegen bzw. möglicherweise sogar ein Einfluss auf die Chlamydosporenentwicklung festgestellt werden.

4.1.2 Anwendung der GFP-Reporterstämme in mating-kompetenten Stämmen

Neben den zahlreichen putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen, die bei der Auswertung der RNA-Sequenzierung unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen identifiziert werden konnten, fielen auch jene Gene auf, die zuvor bereits mit „Switching“ oder „Mating“ in *C. albicans* in Verbindung gebracht wurden. Dass der Lebenszyklus von *C. albicans* sehr viel komplexer ist als bisher angenommen, konnte mit der Entdeckung des Mating in diesem Mikroorganismus deutlich gemacht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch zukünftig die Entwicklung von Chlamydosporen weitere Beachtung finden. Lin und Heitman beobachteten, dass der Basidiomyzet *C. neoformans* nach der Transition zu Hyphe während des Matings ebenfalls in der Lage ist, Chlamydosporen bzw. chlamydosporen-ähnliche Strukturen zu bilden. Diese scheinen sich zwar deutlich von denen in *C. albicans* zu unterscheiden, jedoch ist die biologische Funktion der Chlamydosporen auch für diesen pathogenen Pilz bisher noch nicht geklärt. Da die Chlamydosporenbildung während des Matings beobachtet werden konnte, wurde für *C. neoformans* bereits vermutet, dass deren Bildung zur sexuellen Vermehrung benötigt wird (Lin und Heitman, 2005). Aufgrund dieser Tatsache sowie der Beobachtung, dass auch switching- bzw. matingspezifische Gene bei der Chlamydosporenbildung differentiell reguliert werden, wurden in einem ersten Schritt innerhalb dieser Arbeit überprüft, ob eine ähnliche Aktivierung von *CaCSPI* in Mating-kompetenten *C. albicans*-Stämmen stattfindet. Dafür stellte Prof. Joachim Morschhäuser (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg, Deutschland) freundlicherweise zwei *C. albicans*-Stämme zur Verfügung, die durch genetische Manipulation in ihren *MTL*-Loki homozygot für *MATa* oder *MAT α* sind. Von diesen Stämmen wurden GFP-Reporterstämme für das Gen *CaCSPI* hergestellt. Nach Inkubation unter chlamydosporeninduzierenden Bedingungen konnte bestätigt werden, dass das analysierte Gen auch in Mating-kompetenten **a**- bzw. α -Stämmen während der Chlamydosporenbildung exprimiert wird. Ferner war von Interesse, ob α -Pheromon allein, unter nicht chlamydosporeninduzierenden Bedingungen, zu einer Induktion von *CaCSPI*

führt. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Mit Hilfe der Reporterstämme könnte nun überprüft werden, ob das „chlamydosporenspezifische“ Gen *CaCSP1* möglicherweise während des Matings dieser Stämme exprimiert wird. Da die GFP-Reporterstämme SCMTLaCSP1G1 und SCMTLaCSP1G1 erst gegen Ende des praktischen Teils dieser Arbeit hergestellt wurden, konnten diese Versuche noch nicht durchgeführt werden.

Weiterhin könnte man GFP-Reporterstämme der Gene *CdCSP1* oder *CdCSP2* in *C. dubliniensis*-Stämmen mit homozygoten *MTL*-Loki herstellen, um eventuelle weitere spezies-spezifische Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zu erkennen. Pujol *et al.* konnten zeigen, dass auch für *C. dubliniensis* Stämme existieren, die wie in *C. albicans* **a/α**, **a/a** oder **α/α** sind, jedoch der Anteil an natürlich vorkommenden homozygoten *MTL*-Loki 10-fach höher ist. Darüber hinaus durchläuft auch *C. dubliniensis* das Phänomen des white-opaque-Switchings, und wie in *C. albicans* ist das Switching abhängig von einem homozygoten *MTL*-Lokus. Ebenfalls sind *C. dubliniensis* **a/a** oder **α/α** Zellen zum Mating in der Lage, wenn sie zuvor in die opaque Phase gewechselt haben (Pujol *et al.*, 2004).

Ein anderer Aspekt, welcher auf eine mögliche Beziehung zwischen der Chlamydosporenentwicklung und dem white-opaque-Switching/Mating hinweisen könnte, ist die Temperaturabhängigkeit beider Prozesse. Die Bildung von Chlamydosporen erfolgt bevorzugt bei 25°C, wie auch das Switching in *C. albicans* (Hayes 1966; Kapica *et al.*, 1969, Martin *et al.*, 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine optimale Filamentierung von white-Zellen bei 37°C stattfindet, während opaque-Zellen dafür 25°C bevorzugen und überdies erhöhte Temperaturen einen inhibierenden Effekt zeigten (Si *et al.*, 2013). Das könnte bedeuten, dass die Prozesse der Chlamydosporenbildung und der Filamentierung der Mating-kompetenten Zellform dieselbe Temperatur favorisieren. Darüber hinaus wird filamentöses Wachstum in white-Zellen durch eine Vielzahl an (Umwelt-)Bedingungen ausgelöst, wie beispielsweise Serum, erhöhte Temperatur, neutraler pH-Wert und Nährstoffmangel, welche bei opaque-Zellen keine Filamentierung induzieren. Diese bevorzugen Medium mit wenig Phosphat sowie Sorbitolmedium (Si *et al.*, 2013). Auch hier könnte dies darauf hindeuten, dass sich die gebildeten Filamente von white- und opaque-Zellen unterscheiden, ähnlich wie es für echte Hyphen und Chlamydosporen-tragenden Hyphen vermutet wird (Martin *et al.*, 2005). Somit wären die Bedingungen, die eine Chlamydosporenbildung begünstigen, am ehesten für die opaque Zellform und damit die Mating-kompetente Form gegeben.

Eine Analyse der Genexpression von filamentierenden white- und opaque-Zellen könnte diese Vermutung ebenfalls stützen. Beispielsweise sind die Gene *ALS3*, *HYR1*, *PHR1* und *SAP5* charakteristisch für die Hyphenbildung in white-Zellen, wohingegen sie während der Filamentierung von opaque-Zellen nicht induziert werden (Si *et al.*, 2013). Interessanterweise wurden als spezifische Gene der Filamentierung von opaque-Zellen die GPI-verankerten Zellwandgene *PGA30* und *PGA31* identifiziert (Si *et al.*, 2013). Wie bereits erwähnt, konnten innerhalb der vorliegenden Arbeit bereits *PGA13* und *PGA55* unter den am stärksten herauf regulierten Genen während der Chlamydosporenbildung in Staib-Medium erfasst werden. *PGA30* und *PGA31* wurden ebenfalls im *C. dubliniensis* Wildtyp herauf reguliert.

Aufgrund dieser Beobachtungen und dem Ergebnis des Transkriptionsprofils dieser Arbeit, welches zeigte, dass auch Switching- bzw. Mating-spezifische Gene bei der Chlamydosporenbildung differentiell reguliert werden, sollte auch zukünftig eine mögliche Rolle der Chlamydosporen innerhalb dieser Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Identifizierung von chlamydosporenspezifischen Genen in *C. albicans* und *C. dubliniensis* mittels DNA-Microarrayanalyse

Zur Identifizierung von weiteren *Candida*-Genen, die an der Entwicklung von Chlamydosporen beteiligt bzw. darin involviert sind und mit dem Ziel einen größeren Einblick in die differentielle Genregulation während der Chlamydosporenausbildung zu bekommen, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit mittels DNA-Microarray ein zusätzliches Genexpressionsprofil der Wildtypen *C. albicans* und *C. dubliniensis* sowie der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante unter chlamydosporenspezifischen Bedingungen erstellt.

Im Vergleich mit dem Transkriptionsprofil der RNA-Seq konnten auch mittels DNA-Microarray eine Vielzahl an Genen identifiziert werden, die für uncharakterisierte oder hypothetische Proteine kodieren. Dieses Ergebnis stützt ebenfalls die Annahme, dass die Entwicklung von Chlamydosporen mit einer hohen Spezifität einhergeht. Auch konnten übereinstimmend mit beiden Analysen einige Gene als putativ chlamydosporenspezifische Gene identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die Gene *PGA55* (*orf19.207/CD36_23160*), *orf19.2506/CD36_80940*, *orf19.3885/CD36_31810*, *orf19.6741/CD36_87380*, *CaCSP2/CdCSP2* (*orf19.4170/CD36_40770*), *POX18* (*orf19.3330.3/CD36_01320*), *orf19.2317/CD36_10300* und *orf19.2457/CD36_05580*. Zudem konnte das Gen *CaCSP2/CdCSP2*, als eines von den vier am stärksten herauf

regulierten Genen der RNA-Seq, ebenfalls mit Hilfe der DNA-Microarrays unter den putativ chlamydosporenspezifischen Genen gefunden werden. Auffällig war darüber hinaus, dass das Transkriptionsprofil der DNA-Microarrays nicht von putativen Zellwand- bzw. Plasmamembran-assoziierten Genen dominiert wurde, wie es bei der RNA-Seq der Fall war. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass für das Expressionsprofil der Arrays stets der Vergleich zum YPD-Medium mit berücksichtigt wurde. Dies hatte den Hintergrund bei der Auswertung hyphenspezifische (*C. albicans nrg1Δ*-Mutante bildet Pseudohyphen in YPD-Medium) und mediumspezifische Gene ausschließen zu können. Für die RNA-Seq wurde jedoch nur das Wachstum der Stämme in Staib-Medium untersucht und nicht mit dem in YPD-Medium verglichen. Zudem wurden in dieser Arbeit erstmals eine RNA-Sequenzierung und eine DNA-Microarrayanalyse während des Wachstums in Staib-Medium durchgeführt und damit zwei unterschiedliche Techniken verwendet. Die Abhängigkeit von einer annotierten Genomsequenz stellt dabei einen zentralen Nachteil von DNA-Microarrays dar. Mit der RNA-Sequenzierung konnte in den letzten Jahren jedoch eine äußerst leistungsfähige Technologie etabliert werden, die auf der Sequenzierung einzelner Transkripte basiert. Somit ist eine weitaus präzisere Messung von Transkripten und Transkriptmengen möglich (Wang *et al.*; 2009). Auch können wie bereits beschrieben, unbekannte Transkripte charakterisiert werden, während DNA-Microarrays an die Verfügbarkeit von bereits vorhandenen Sequenzdaten gebunden sind. Ein direkter Vergleich ist somit aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen der Analysen schwierig und begründet die zum Teil nur geringen Überschneidungen/Übereinstimmungen der erhaltenen Transkriptionsprofile.

Einen weiteren Unterschied zeigte das Profil der DNA-Microarrayanalyse hinsichtlich einer größeren Anzahl an identifizierten Genen, die für Enzyme und Transporter des Kohlenhydratstoffwechsels kodieren. Dazu gehören beispielsweise die Gene *MAL31/CD36_54530*, *orf19.3982/CD36_54540* und *orf19.7437/CD36_86460*.

In einer unveröffentlichten Studie untersuchten Citiulo *et al.* die Biologie von Chlamydosporen und verglichen dafür, mittels einer globalen Genexpressionsanalyse, Hefezellen und Chlamydosporen von *C. dubliniensis* (Citiulo *et al.*, 2010; *BioProject PRJNA125801*). Dabei zeigte sich zum einen, dass 11% der in Chlamydosporen herauf regulierten Gene über den Repressor Nrg1 reguliert werden und zum anderen, dass diese Gene hauptsächlich in den Glukosemetabolismus bzw. -transport involviert sind. Dies würde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit einhergehen, wenngleich hier vor allem Gene des Maltosestoffwechsels bzw. -transportes aufgefallen waren. Steigende

Konzentrationen an Glukose inhibieren die Chlamydosporenbildung. Zudem bevorzugen Chlamydosporen lediglich geringe Mengen an leicht verfügbaren Kohlenstoffquellen für ihre Entwicklung (Hayes 1966; Kapica *et al.*, 1969; Janson und Nickerson, 1970b). Demnach spielt die Bereitstellung und Verwertung von Kohlenhydraten bzw. Kohlenstoff eine wichtige Rolle in der Chlamydosporenbildung, so dass es nahe liegt, dass Gene des Kohlenhydratmetabolismus auch mit Hilfe des Transkriptionsprofils dieser Arbeit identifiziert wurden.

Des Weiteren konnten, wie auch bei der RNA-Sequenzierung, mehrere Gene identifiziert werden, die zuvor in Verbindung mit „Mating“ oder „Switching“ in *C. albicans* gebracht wurden. Auch dies würde mit den Expressionsdaten von Citiluo *et al* übereinstimmen, die ebenfalls Gene dieser Kategorie innerhalb ihres Transkriptionsprofils fanden.

4.2.1 Funktionelle Analyse ausgewählter chlamydosporenspezifischer Gene

Wie unter 3.7.2 ausführlich beschrieben, wurden nach sorgfältiger Auswertung der Genexpressionsdaten einige der identifizierten Gene zur weiteren Analyse ausgewählt. Mit Hilfe von gezielten Deletionsmutanten in den *C. dubliniensis* Genen *CD36_06420*, *CD36_15800*, *CD36_19040*, *CD36_23160*, *CD36_31810*, *CD36_54540*, *CD36_80940*, *CD36_87380*, *CD36_28430* (*CdIME2*), *CD36_01320* (*CdPOX18*) und *CD36_34590* (*CdSUC1*) bzw. *IME2* in *C. albicans* und der Herstellung von Überexpressionsstämmen für die *C. albicans* Gene *RFX1*, *WOR2*, *orf19.4046* und *orf19.6845*, sollten diese Gene schließlich weiter funktionell charakterisiert werden.

Zunächst konnten die erhaltenen Expressionswerte der DNA-Microarrayanalyse mit Hilfe von quantitativer Real-Time-RT-PCR für ausgewählte Gene bestätigt werden.

Bei der Untersuchung, inwiefern die ausgewählten Gene bei der Chlamydosporenbildung eine Rolle spielen, zeigte sich, dass keine der Deletionsmutanten die Fähigkeit zur Chlamydosporenproduktion verloren hatte. Das bedeutet, dass der Funktionsverlust eines dieser Gene nicht zu einer Störung in der Entwicklung von Chlamydosporen führt bzw. dass die Gene scheinbar nicht essentiell für die Chlamydosporenbildung in Staib-Medium sind. Ebenfalls zeigten die Überexpressionsstämmen keine veränderte oder gar verstärkte Chlamydosporenentwicklung. Man muss auch hier, wie für die unter 4.1.1 beschriebenen Deletionsmutanten der Gene *CdCSP1/2*, berücksichtigen, dass es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine funktionellen Tests für Chlamydosporen gibt. Daher lässt sich nicht

überprüfen und sicher sagen, ob es tatsächlich keine Unterschiede zu wildtypischen Chlamydosporen gibt.

In weiteren Versuchen wurden die hergestellten Deletionsmutanten und Überexpressionsstämme unter nicht-chlamydosporeninduzierenden Bedingungen phänotypisch untersucht. Auch hierbei konnte für keine der getesteten Bedingungen bzw. Substanzen ein Unterschied hinsichtlich der Wachstumsfähigkeit bzw. ein phänotypischer Unterschied zwischen den Transformanten und dem entsprechenden Wildtyp-Stamm festgestellt werden. Dies kann zum einen bedeuten, dass keine der untersuchten Bedingungen für die jeweiligen Gene bzw. deren Funktion eine Rolle spielt. Durch weiteres Überprüfen der hergestellten Stämme unter anderen, noch nicht getesteten Bedingungen, könnten sich jedoch phänotypische Unterschiede zu den Wildtyp-Stämmen zeigen. Zum anderen kann es aber auch bedeuten, dass die ausgewählten Gene keine zentrale Rolle innerhalb der Zelle spielen, so dass ihrer Deletion bzw. Überexpression auch nicht mit einer Veränderung in der Wachstumsfähigkeit des Pilzes einhergeht. Dahingehend wäre es beispielsweise interessant für die Gene *CD36_54540* und *CD36_34590* (*CdSUC1*) eine Doppelmutante herzustellen. Möglicherweise wäre mit der Deletion einer Maltase (*CD36_54540*) sowie eines Transkriptionsfaktors (*CdSUC1*), der die α -Glykosidase-Expression reguliert, die Kohlenhydratverwertung der Zelle weitgehender verändert und hätte möglicherweise auch Auswirkungen auf die gesamte Wachstumsfähigkeit des Organismus.

Speziell für die Chlamydosporenbildung ist es generell fraglich, ob der Funktionsverlust eines Gens ausreicht um den gesamten morphologischen Prozess zu unterbinden oder zu verändern. Wahrscheinlich handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess und ob es neben Nrg1 noch einen weiteren zentralen Regulator gibt, bleibt spekulativ. Mit großer Wahrscheinlichkeit könnte man jedoch, über weitere Transkriptionsanalysen unter (anderen) chlamydosporeninduzierenden Bedingungen, neue chlamydosporenspezifische Gene identifizieren und auf diesem Weg neue Erkenntnisse über die genetische Regulation und biologische Funktion dieser morphologischen Struktur gewinnen.

4.2.2 Deletion des Transkriptionsfaktors Csr1 in *C. dubliniensis*

Aufgrund der beschriebenen Kenntnisse über die Rolle des Transkriptionsfaktors *CSR1* in *C. albicans*, sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob eine Deletion des Homologs in *C. dubliniensis* ebenfalls zu einem Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen führt bzw. das filamentöse Wachstum gestört ist.

Für den ersten Teil der Untersuchungen konnte dies bestätigt werden. Wie für *C. albicans* und auch in *S. cerevisiae* beschrieben, zeigte die *CdCSR1*-Deletionsmutante eine verminderte Wachstumsfähigkeit unter zinklimitierten Bedingungen. Als eine mögliche Erklärung dafür wird die Funktion von *CSR1* (in *C. albicans*) als transkriptioneller Aktivator zahlreicher Gene beschrieben (Zhao *et al.*, 1998). Sowohl für *C. albicans* als auch für *S. cerevisiae* konnte beobachtet werden, dass *CSR1* bzw. *ZAP1* als Regulator der Zinkhomöostase für eine erhöhte Expression der Zinktransporter *ZRT1* und *ZRT2* unter zinklimitierten Bedingungen verantwortlich ist und, dass diese in *CSR1*-Deletionsmutanten herab reguliert werden (Zhao und Eide, 1996a/b; Nobile *et al.*, 2009). Ebenfalls stimuliert *CSR1* die Freisetzung von Zink aus den Vakuolen, indem es die Expression des Transporters *ZRT3* aktiviert (MacDiarmid *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008). Mit der Deletion von *CSR1* entfällt die erhöhte Expression der Zielgene *ZRT1*, *ZRT2* und *ZRT3* unter Zinklimitation und begründet so den Wachstumsdefekt der Pilze unter dieser Bedingung. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *C. albicans* und *C. dubliniensis* könnte eine ähnliche Regulation der Zinktransporter in *C. dubliniensis* existieren und auch hier den Wachstumsdefekt hervorrufen. Homologe von *ZRT1* und *ZRT2* in *C. dubliniensis* sind ebenfalls als putative Zinktransporter bzw. für *ZRT3* als putatives Membrantransportprotein der Vakuole beschrieben. Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste man die Expressionswerte der Transporter ebenfalls in der *CdCSR1*-Deletionsmutante überprüfen.

Erst kürzlich gelang es Citiulo *et al.* die molekularen Mechanismen der Zinkakquise von *C. albicans* aus dem Wirt näher zu charakterisieren. Sie zeigten, dass *C. albicans* über das extrazelluläre Protein Pra1 in der Lage ist, Zink aus seiner Umgebung zu binden, um dann über den Transporter Zrt1 wieder mit der Pilzzelle zu reassoziieren. Eine Deletion von *PRA1* unterband zudem die Sequestration und Nutzung von Zink aus dem Wirtsgewebe und hemmte die Schädigung der Wirtszellen in Abwesenheit von exogenem, freien Zink (Citiulo *et al.*, 2012). Zukünftige Untersuchungen könnten sich demzufolge damit beschäftigen, ob eine Überexpression des Zinktransporters *ZRT1* oder des

Zelloberflächenproteins *PRA1* in der *Cdcsr1Δ*-Mutante den Wachstumsdefekt unter zinklimitierten Bedingungen aufheben würde.

In *C. albicans* führte die Deletion von *CSR1* darüber hinaus zu einem Defekt im filamentösen Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen (Bird *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008). Dies konnte in *C. dubliniensis* nicht beobachtet werden. Kim *et al.* vermuteten, dass die gestörte Filamentierung in der *C. albicans csr1Δ*-Mutante mit einer veränderten Expression hyphenspezifischer Gene assoziiert ist und konnten zeigen, dass die Transkriptmenge des hyphenspezifischen Gens *HWPI* in den *csr1Δ*-Mutanten signifikant reduziert ist. Inzwischen kennt man noch weitere hyphenspezifische Zielgene von *CSR1*, wie *RBT1*, *HYR1* und *IHD1* (Nobile *et al.*, 2009). Kim *et al.* beobachteten außerdem, dass eine Überexpression der Transporter Zrt1 und Zrt2 den Defekt der Hyphenbildung der *csr1Δ*-Mutante in Spider-Medium suppressierte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Filamentierung in *C. albicans* eng mit dem Zinkgehalt der Zelle assoziiert zu sein scheint und *CSR1* dabei eine zentrale Rolle im Rahmen der Regulation spielt. Da *C. dubliniensis* ebenfalls in der Lage ist Keimschläuche und echte Hyphen zu bilden, wurde für die *CdCSR1*-Deletionsmutante in gleicher Weise mit einem Defekt im filamentösen Wachstum unter hypheninduzierenden Bedingungen gerechnet. Dies konnte, wie bereits erwähnt, nicht beobachtet werden. Da die Hypheninduktion für *C. dubliniensis* generell schwieriger bzw. langsamer ist als für *C. albicans* und zudem in Spider-Medium für *C. dubliniensis* innerhalb dieser Arbeit nicht gelang, wurden andere hypheninduzierende Bedingungen getestet (siehe 3.10.3), als für *C. albicans* diesbezüglich beschrieben. Somit könnte es zum einen möglich sein, dass *CSR1* in *C. dubliniensis* keinen Einfluss auf die Filamentierung hat bzw. es mediumspezifisch reguliert wird. Man müsste daher auch die *C. albicans csr1Δ*-Mutanten unter anderen hypheninduzierenden Bedingungen überprüfen. Zum anderen kennt man bisher keine Zielgene von *CSR1* in *C. dubliniensis* und müsste diese ermitteln, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu *C. albicans* zu finden. Dass die Transporter Zrt1, Zrt2 und Zrt3 mögliche Zielgene von *CdCSR1* sind, liegt aufgrund der Ergebnisse nahe. Das bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass andere Zielgene von *CSR1* in *C. albicans*, wie z. B. *HWPI*, in *C. dubliniensis* ebenfalls von *CdCSR1* reguliert werden. Zudem gibt es bekanntermaßen große Unterschiede im Genom beider *Candida*-Spezies, die besonders hyphenspezifische Gene betreffen.

Infolge der beschriebenen Ergebnisse für *CSR1* hinsichtlich des Hyphenwachstums, war im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse, ob Zink und/oder die Deletion von

CSRI in *C. dubliniensis* einen Einfluss auf die Chlamydosporenbildung hat. Dabei zeigte sich, dass die *CdCSRI*-Deletionsmutante nicht in ihrer Chlamydosporenentwicklung beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass es zwar ebenfalls zu einem Wachstumsdefekt der *Cdcsr1Δ*-Mutante auf Staib-Agar kommt, dieser jedoch, wie auch unter nicht-chlamydosporeninduzierenden Bedingungen, mit steigender Konzentration an Zink aufgehoben wurde. Zudem hatten die verschiedenen getesteten Zinkkonzentrationen keinen Einfluss auf die Chlamydosporenbildung. Eine Erklärung dafür könnte in den Expressionsdaten der RNA-Seq zu finden sein. Während des Wachstums in Staib-Medium wurde *CSRI* schwach herab reguliert und die Transporter schwach herauf bzw. ebenfalls herab reguliert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Regulation der Zinkhomöostase während der Chlamydosporenbildung in Staib-Medium keine Rolle spielt und somit unabhängig von der umgebenden (getesteten) Zinkkonzentration eine Chlamydosporenbildung möglich ist. Über die Chlamydosporenbildung in der *C. albicans csr1Δ*-Mutante ist bisher nichts bekannt. Allerdings beobachteten Nobile *et al.* bereits in Biofilmen der *csr1Δ*-Mutante ein Übermaß an Hefezellen und runden Zellen, die morphologisch an Chlamydosporen erinnerten. (Nobile *et al.*, 2009). Um zu testen, ob es sich dabei tatsächlich um Chlamydosporen handelt, könnte mit den in dieser Arbeit hergestellten GFP-Reporterkonstrukten überprüft werden.

4.3 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit erstellten Transkriptionsprofilen wurde zum ersten Mal ein umfangreiches Set an differentiell regulierten Genen während des Wachstums von *C. albicans*, *C. dubliniensis* und *C. albicans nrg1Δ*-Mutante in Staib-Medium bereitgestellt. Diese Profile bieten eine hilfreiche und fundamentale Grundlage für zahlreiche weitere Untersuchungen hinsichtlich der Chlamydosporenentwicklung sowie der Vergleichbarkeit zwischen *C. albicans* und *C. dubliniensis*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es zudem erstmals Proteine zu identifizieren, die für die morphologische Struktur „Chlamydospore“ spezifisch sind. Diese könnten künftig als Marker Verwendung finden bzw. könnten die hergestellten GFP-Reporterstämme als nützliches molekularbiologisches Werkzeug zum Einsatz kommen.

Um weitere funktionelle und genetische Kenntnisse über die morphologische Struktur der Chlamydospore zu erlangen, ist die Identifizierung von Signalwegen und regulatorischen Faktoren, welche die Chlamydosporenbildung beeinflussen auch zukünftig unerlässlich.

Dabei könnten die Ergebnisse dieser Arbeit, kombiniert mit der Erstellung neuer Transkriptionsprofile unter anderen chlamydosporeninduzierenden Bedingungen, hilfreich sein. Ebenfalls könnte man weitere geeignete Kandidaten der identifizierten Gene der Transkriptionsprofile dieser Arbeit auswählen und hinsichtlich ihrer möglichen Rolle während der Chlamydosporenbildung überprüfen sowie eine funktionelle Charakterisierung durchführen.

Literaturverzeichnis

Ainsworth G.C.; (1961)

A Dictionary of the Fungi.

Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.

Al Mosaid A., Sullivan D.J., Coleman D.C.; (2003)

Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar.

J Clin Microbiol 41:4787–9.

Al Mosaid A., Sullivan D., Salkin I.F., Shanley D., Coleman D.C.; (2001)

Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar.

J Clin Microbiol 39(1):323–7.

Alonso-Monge R., Navarro-García F., Roman E., I. Negredo A. I., Eisman B., Nombela C., Pla J.; (2003)

The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Essential in the Oxidative Stress Response and Chlamydospore Formation in *Candida albicans*.

Eukaryotic Cell 2(2):351–61.

Alves S.H., de Loreto E.S., Linares C.E., Silveira C.P., Scheid L.A., Pereira D.I., Santuario J.M.; (2006)

Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.

Rev Inst Med Trop Sao Paulo 48:119–21.

Anderson J.M. and Soll D.R.; (1987)

Unique phenotype of opaque cells in the white-opaque transition of *Candida albicans*.

J Bacteriol 169(12):5579–88.

Andreini C., Bertini I., Rosato A.; (2009)

Metalloproteomes: a bioinformatic approach.

Acc Chem Res 42:1471–1479.

Arnaud, M. B., Costanzo, M. C., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Lane, C., Miyasato, S. R., Sherlock, G.; (2005)

The Candida Genome Database (CGD), a community resource for *Candida albicans* gene and protein information.

Nucleic Acids Res 33:D358–363.

Bakerspigel A., (1962)

Sodium Taurocholat Medium for Identification of *Candida albicans*.

J Bacteriol 83:694.

Bakerspigel A. and Burke S. ;(1974)

A possible function of the chlamydospores of *Candida albicans*.

Mycopathol Mycol Appl 54:147–52.

Banerjee M., Thompson D.S., Lazzell A., Carlisle P.L., Pierce C., Monteagudo C., López-Ribot J.L., Kadosh D.; (2008)

UME6, a novel filament-specific regulator of *Candida albicans* hyphal extension and virulence.

Mol Biol Cell 19:1354–1365.

Bedell G. W. and Soll D. R.; (1979)

Effects of low concentrations of zinc on the growth and dimorphism of *Candida albicans*: Evidence for zinc-resistant and -sensitive pathways for mycelium formation.

Infect. Immun. 26:348–354.

Bennett R.J. and Johnson A.D.; (2006)

The role of nutrient regulation and the Gpa2 protein in the mating pheromone response of *C. albicans*.
Mol Microbiol 62(1):100-19.

Bensen E.S., Martin S.J., Li M., Berman J., Davis D.A.; (2004)

Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p.
Mol Microbiol 54(5):1335-51.

Berman J. and Sudbery E.; (2002)

Candida albicans: A Molecular Revolution Built on Lessons from Budding Yeast.
Nature Reviews 3:918-930.

Bernhardt E.; (1946)

Time saving in the preparation of corn meal agar and in the identification of yeast-like fungi.
Mycologia 38:228-9.

Bird A.J., Zhao H., Luo H., Jensen L.T., Srinivasan C., Evans-Galea M., Winge D.R., Eide D.J.; (2000)

A dual role for zinc fingers in both DNA binding and zinc sensing by the Zap1 transcriptional activator.
EMBO J 19:3704-3713.

Birnboim H.C. and Doly J.; (1979)

Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid-DNA.
Nucleic Acids Res 7:1513-1523.

Biswas K. and Morschhäuser J.; (2005)

The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*.
Mol Microbiol 56(3):649-69.

Biswas S., Van Dijck P., Datta A.; (2007)

Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*.
Microbiology and Molecular Biology 71(2):348-376.

Boerlin P., Boerlin-Petzold F., Durussel C., Addo M., Pagani J. L., Chave J. P., Bille J.; (1995)

Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users.
J. Clin. Microbiol 33:1129-1135.

Bonhomme J., Chauvel M., Goyard S., Roux P., Rossignol T., d'Enfert C.; (2011)

Contribution of the glycolytic flux and hypoxia adaptation to efficient biofilm formation by *Candida albicans*.
Mol Microbiol 80(4):995-1013.

Brandt M.E., Harrison, L.H., Pass, M., Ofair A.N., Huie S., Li R.K., Morrison Ch.J., Warnock D.W., Hajjeh R.A.; (2000)

Candida dubliniensis Fungemia: the First Four Cases in North America.
Emerging Infectious Diseases 6:46-49.

Braun B.R., Head W.S., Wang M.X., Johnson A.D.; (2000)

Identification and Characterization of *TUP1*-Regulated Genes in *Candida albicans*.
Genetics 156:31-44.

Braun B.R. and Johnson A.D.; (1997)

Control of Filament Formation in *Candida albicans* by the Transcriptional Repressor *TUP1*.
Science 277(105):105-109.

Braun B.R. and Johnson A.D.; (2000)

TUP1, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*.
Genetics 155(1):57-67.

Braun B.R., Kadosh D., Johnson A.D.; (2001)

NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction.
EMBO J 20:4753-4761.

Brown J.P. and Gow N.A.; (1999)

Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis.
Trends Microbiol 7(8):333-8. Review.

Brown A.J., Odds F.C., Gow N.A.; (2007)

Infection-related gene expression in *Candida albicans*.
Curr Opin Microbiol 10:307-313.

Buffo J., Herman M.A., Soll D.R.; (1984)

A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.
Mycopathologia 85:21-30.

Calderone R.A.; (2002)

Candida and Candidiasis.
 ASM PRESS, Washington D.C.

Calderone R.A. and Fonzi W.A.; (2001)

Virulence factors of *Candida albicans*.
Trends Microbiol 9:327-335.

Chabasse D., Bouchara J.P., de Gentile L., Chennebault J.M.; (1988)

Candida albicans chlamydospores observed in vivo in a patient with AIDS.
Ann Biol Clin (Paris) 46:817-18.

Citiulo F., Jacobsen I.D., Miramón P., Schild L., Brunke S., Zipfel P., Brock M., Hube B., Wilson D.; (2012)

Candida albicans Scavenges Host Zinc via Pra1 during Endothelial Invasion.
PLoS Pathog 8(6):e1002777.

Citiulo F., Moran G.P., Sullivan D. – unveröffentlichte Studie, 2010

Transcriptional profile analysis of *Candida dubliniensis* chlamydospores compared to yeast cells.
BioProject PRJNA125801.

Clark T.A. and Hajjeh R.A.; (2002)

Recent trends in epidemiology of invasive mycoses.
Current Opinion in Infection Disease 15:569-574.

Cole G.T., Seshan K.R., Phaneuf M., Lynn K.T.; (1991)

Chlamydospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice.
Can J Microbiol 37:637-46.

Coleman D. C., Sullivan, D. J., Mossman, J. M.; (1997)

Candida dubliniensis.
J. Clin Microbiol 35:3011-3012.

Corbin B.D., Seeley E.H., Raab A., Feldmann J., Miller M.R., Torres V.J., Anderson K.L., Dattilo B.M., Dunman P.M., Gerads R., Caprioli R.M., Nacken W., Chazin W.J., Skaar E.P.; (2008)

Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses.
Science 319:962-965.

Csank C., Schroppel K., Leberer E., Marcus D., Mohamed O., Meloche S., Thomas D.Y., Whiteway, M. (1998)

Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis.
Infect Immun 66:2713-2721.

Dalle F., Wächtler B., L'Ollivier C., Holland G., Bannert N., Wilson D., Labuère C., Bonnin A., Hube B.; (2010)

Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes.
Cellular Microbiology 12(2):248–271, 2010.

Davis D.A.; (2009)

How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence.
Curr Opin Microbiol 12:365-370.

De Groot P.W., Hellingwerf K.J., Klis F.M.; (2003)

Genome-wide identification of fungal GPI proteins.
Yeast 20:781-796.

De Loreto E.S., Pozzatti P., Alves Scheid L., Santurio D., Morais Santurio J., Alves S.H.; (2008)

Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on rosemary extract agar and oregano extract agar.
J Clin Lab Anal 22(3):172-7

Dignard D. and Whiteway M.; (2006)

SST2, a regulator of G-protein signaling for the *Candida albicans* mating response pathway.
Eukaryot Cell 5:192-202.

Dujardin L., Walbaum S., Biguet J.; (1980a)

Chlamydosporulation in "*Candida albicans*". Course of the morphogenesis; influence of light and sowing density (author's transl).
Ann Microbiol(Paris) 131A:141–9.

Dujardin L., Walbaum S., Biguet J.; (1980b)

Effect of glucose and nitrogen concentrations on the morphology of *Candida albicans* and the formation of chlamydospores in synthetic culture media.
Mycopathologia 71:113–18.

Eide, D. J.; (2001)

Functional genomics and metal metabolism.
Genome Biol 2:1028.1-1028.3.

Eisman B., Alonso-Monge R., Roman E., Arana D., Nombela C., Pla J.; (2006)

The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*.
Eukaryot Cell 5:347–58.

Elorza M. V., Rico H., Sentandreu P.; (1983)

Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells.
J. Gen. Microbiol 129:1577–1582.

Engelmann E.; (1999)

Sproßpilze. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie
(Hrsg.: Hahn, H., Falke, D., Kauffman, S., Ullmann U.)
Springer Verlag Berlin Heidelberg New York:701-710.

Feo M. and de Pacheco A.; (1976)

Candida albicans: milk in the production of Chlamydospores.
Rev Latinoam Microbiol 18:23–24.

Fidel P.L.; (1999)

Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: Site-specific differences.
Revista iberoamericana de Micologia 16:8-15.

Fisher J.B. and Kane J.; (1968)

Production of chlamydospores by *Candida albicans* cultivated on dilute oxgall agar.
Mycopathol Mycol Appl 35:223–9.

Fitzpatrick D.A., O'Gaora P., Byrne K.P., Butler G.; (2010)

Analysis of gene evolution and metabolic pathways using the Candida Gene Order Browser.
BMC Genomics 11:290.

Fleming W.H., Hopkins J.M., Land G.A.; (1977)

New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*.
J Clin Microbiol 5:236–43.

Foiani M., Nadjar-Boger E., Capone R., Sagee S., Hashimshoni T., Kassir Y.; (1996)

A meiosis-specific protein kinase, Ime2, is required for the correct timing of DNA replication and for spore formation in yeast meiosis.
Mol. Gen. Genet 253:278-288.

Fonzi W.A.; (2002)

Role of pH response in *Candida albicans* virulence.
Mycoses 45(1):16-21.

Fridovich, I.; (1978)

The biology of oxygen radicals.
Science 201:875–880.

Gelis S., de Groot P.W., Castillo L., Moragues M.D., Sentandreu R., Gómez M.M., Valentín E.; (2012)

Pga13 in *Candida albicans* is localized in the cell wall and influences cell surface properties, morphogenesis and virulence.
Fungal Genet Biol 49:322-331.

Georgopapadakou, N.H.; (1998)

Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs.
Curr Opin Microbiol 1:547-557.

Gillum A.M., Tsay E.Y., Kirsch D.R.; (1984)

Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations.
Mol Gen Genet 198:179-182.

Giusani A.D., Vences M., Kumamoto C.A.; (2002)

Invasive filamentous growth of *Candida albicans* is promoted by Czf1p-dependent relief of Efg1p-mediated repression.
Genetics 160:1749–53.

Glöckner A.; (2011)

Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin: review of the literature.
Eur J Med Res 28;16(4):167-79.

Gow N.A., Brown A.J., Odds F.C.; (2002)

Fungal morphogenesis and host invasion.
Curr Opin Microbiol 5(4):366-71.

Gow N.A. and Gadd, G.M. ; (1995)

The Growing Fungus.
Chapman and Hall, London, UK.

Gubbins P.O. and Heldenbrand S.; (2010)

Clinically relevant drug interactions of current antifungal agents.
Mycoses 53(2):95-113.

Guttmann-Raviv N., Martin S., Kassir Y.; (2002)

Ime2, a meiosis-specific kinase in yeast, is required for destabilization of its transcriptional activator, Ime1.
Mol Cell Biol 22(7):2047-56.

Gurusamy K. and Davidson B.R.; (2007)

Trace element concentration in metastatic liver disease: a systematic review.
J Trace Elem Med Biol 21:169–177.

Hao B., Clancy C.J., Cheng S., Raman S.B., Iczkowski K.A., Nguyen M.H.; (2009)

Candida albicans RFX2 encodes a DNA binding protein involved in DNA damage responses, morphogenesis, and virulence.
Eukaryot Cell. 8(4):627–39.

Härtl A., Hillesheim H.G., Kunkel W., Schrunner E.J.; (1995)

The *Candida* infected hen's egg. An alternative test system for systemic anticandida activity.
Arzneimittelforschung 45:926–928.

Hawksworth, D.L., (2001)

The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited.
Mycol Res 105:1422–1432.

Hayes A.B.; (1966)

Chlamydospore production in *Candida albicans*.
Mycopathol Mycol 29:87–96.

Hazan, K.C.; (1995)

New and emerging yeast pathogens.
Clin Microbiol Res 8:462–478.

Hecker M., Goertsches R.H., Engelmann R., Thiesen H.J., Guthke R.; (2009)

Integrative modeling of transcriptional regulation in response to antirheumatic therapy.
BMC Bioinformatics 10(1):262.

Hendry A.; (1971)

Studies on the morphology and growth patterns of *Candida albicans*.
Ph.D. Thesis, University of Western Ontario, London, Ontario.

Hertz-Fowler C., Peacock C.S., Wood V., Aslett M., Kerhornou A., Mooney P., Tivey A., Berriman M., Hall N., Rutherford K., Parkhill J., Ivens A.C., Rajandream M.A., Barrell B.; (2004)

Genedb: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms.
NucleicAcids Res, 32(Database issue):D339 {D343.

Hornby J.M., Kebaara B.W., Nickerson K.W.; (2003)

Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol.
Antimicrob Agents Chemother 47(7):2366–9.

Hoyer L.L.; (2001)

The *ALS* gene family of *Candida albicans*.
Trends Microbiol 9:176–180.

Hube B., Monod M., Schofield D.A., Brown A.J., Gow N.A.; (1994)

Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*.
Mol Microbiol 14:87–99.

Hull C.M. and Johnson A.D.; (1999)

Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*.
Science 285:1271–1275.

Jabra-Rizk M.A., Baqui A.A., Kelley J.I., Falkler W.A., Merz W.G., Meiller T.F.; (1999)

Identification of *Candida dubliniensis* in a Prospective Study of Patients in the United States.
J. Clin. Microbiol. 37:321–326.

Jackson A.P., Gamble J.A., Yeomans T., Moran G.P., Saunders D., Harris D., Aslett M., Barrell J.F., Butler G., Citiul F., Coleman D.C., de Groot P.W., Goodwin T.J., Quail M.A., McQuillan J., Munro C.A., Pain A., Poulter R.T., Rajandream M.A., Renauld H., Spiering M.J., Tivey A., Gow N.A., Barrell B., Sullivan D.J., Berriman M.; (2009)

Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*.
Genome Res. 19:2231-2244.

Jacobsen I.D., Grosse K., Hube B.; (2012)

Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi.
Methods Mol Biol. 845:487-96.

Jansons V.K. and Nickerson W.J.; (1970a)

Chemical composition of chlamydospores of *Candida albicans*.
J Bacteriol 104:922–32.

Jansons V.K. and Nickerson W.J.; (1970b)

Induction, morphogenesis, and germination of the chlamyospore of *Candida albicans*.
J Bacteriol 104:910-921.

Kadosh D. and Johnson A.D.; (2001)

Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*.
Mol Cell Biol 21(7):2496-505.

Kadosh D. and Johnson A.D.; (2005)

Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis.
Mol Biol Cell 16(6):2903-12.

Kapteyn J.C., Hoyer L.L., Hecht J.E., Müller W.H., Andel A., Verkleij A.J., Makarow M., Van Den Ende H., Klis F.M.; (2000)

The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants.
Mol Microbiol 35: 601–611

Kapica L., Clifford A., Noik M.; (1969)

“Room temperature” incubation for chlamyospore production by *Candida albicans*.
Mycopathol Mycol 37:338–44.

Kehl-Fie T.E. and Skaar E.P.; (2010)

Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc.
Curr Opin Chem Biol. 14(2):218-24.

Kelly R. and Kwon-Chung K.J.; (1992)

A zinc finger protein from *Candida albicans* is involved in sucrose utilization.
J Bacteriol 174(1):222-32.

Khan Z.U., Ahmad S., Mokaddas E., Chandy R.; (2004)

Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.
Clin Microbiol Infect 10(6):590-2.

Khan Z.U., Ahmad S., Mokaddas E., Chandy R.; (2004)

Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.
J Clin Microbiol 42:4796–8.

Kibbler C.C., Seaton S., Barnes R.A., Gransden W.R., Holliman R.E., Johnson E.M., Perry J.D., Sullivan D.J., Wilson J.A.; (2003)

Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales.
J Hosp Infect 54(1):18-24.

Kim M.J., Kil M., Jung J.H., Kim J.; (2008)

Roles of Zinc-responsive Transcription Factor Csr1 in Filamentous Growth of the Pathogenic Yeast *Candida albicans*.

J Microbiol Biotechnol. 18(2):242-7.

Kirkpatrick W. R.; (1998)

Detection of *C.dubliniensis* in Oropharyngeal Samples from HIV-infected Patients in North America by primary CHROMagar Candida Screening and Susceptibility Testing of Isolates.

J. Clin. Microb 36:3007-3012.

Klengel T., Liang W.J., Chaloupka J., Ruoff C., Schroppel K., Naglik J.R., Eckert S.E., Mogensen E.G., Haynes K., Tuite M.F., Levin L.R., Buck J., Muhlschlegel F.A.; (2005)

Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO(2) Sensing with cAMP Signaling and Virulence.

Curr Biol 15:2021-2026.

Klis F.M., Sosinska G.J., de Groot P.W., Brul S.; (2009)

Covalently linked cell wall proteins of *Candida albicans* and their role in fitness and virulence.

FEMS Yeast Res 9(7):1013-28.

Knoll L.J., Johnson D.R., Gordon J.I.; (1994)

Biochemical studies of three *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA synthetases, Faa1p, Faa2p, and Faa3p.

J Biol Chem 269(23):16348-56.

Koh A.Y., Köhler J.R., Cogshall K.T., Van Rooijen N., Pier G.B.; (2008)

Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination.

Plos Pathogens 4(2):1-10.

Kurtzman C. P. and Fell J.W.; (1998)

The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th ed. edn.

Amsterdam: Elsevier Science.

Kurzai O., Heinz W.J., Sullivan D.J., Coleman D.C., Frosch M., Mühlischlegel, F.A.; (1999)

Rapid PCR Test for Discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Isolates Using Primers Derived from the pH-Regulated *PHR1* and *PHR2* Genes of *C. albicans*.

J. Clin. Microbiol 37:1587-1590.

Kurzai O., Korting H.-Ch., Harmsen D., Bautsch W., Molitor M., Frosch M., Mühlischlegel F.A.; (2000)

Molecular and phenotypic identification of the Yeast Pathogen *Candida dubliniensis*.

J. Mol. Med 78:521-529.

Kreger-van Rij N.J.W.; (1984)

The Yeasts, A Taxonomic Study.

Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Kwon-Chung K.J. and Bennett J.E.; (1992)

Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia.

Lan C.Y., Newport G., Murillo L.A., Jones T., Scherer S., Davis R.W., Agabian N.; (2002)

Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*.

Proc Natl Acad Sci U S A 99(23):14907-12.

Lane S., Birse C., Zhou S., Matson R., Liu H.; (2001)

DNA array studies demonstrate convergent regulation of virulence factors by Cph1, Cph2, and Efg1 in *Candida albicans*.

J Biol Chem 276(52):48988-96.

Lin X. and Heitman J.; (2005)

Chlamydospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*.

Eukaryot Cell 4:1746-54.

Liu H.; (2001)

Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*.
Current opinion in Microbiology 4:728-735.

Liu H., Köhler J., Fink G.R.; (1994)

Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a *STE12* homolog.
Science 266:1723-1726.

Liu Y and Filler S.G.; (2011)

Candida albicans Als3, a multifunctional adhesin and invasion.
Eukaryotic Cell 10(2):168-173.

Lo H.J., Kohler J.R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G.R.; (1997)

Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent.
Cell 90:939-949.

Lockhart S.R., Pujol C., Daniels K.J., Miller M.G., Johnson A.D., Pfaller M.A., Soll D.R.; (2002)

In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type.
Genetics 162:737-745.

Lorenz M.C., Bender J.A., Fink G.R.; (2004)

Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages.
Eukaryot Cell 3(5):1076-87.

Lu Y., Su C., Wang A., Liu H.; (2011)

Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance.
PLoS Biol 9(7):1-17;e1001105.

MacDiarmid C.W., Gaither L.A., Eide D.; (2000)

Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO J 19(12):2845-2855.

Magee B.B. and Magee P.T.; (2000)

Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTL α* strains.
Science 289:310-313.

Maidan M.M., De Rop L., Serneels J., Exler S., Rupp S., Tournu H., Thevelein J.M., Van Dijck P.; (2005)

The G protein-coupled receptor Gpr1 and the G alpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*.
Mol Biol Cell 16:1971-1986.

Martin S.W., Douglas L.M., Konopka J.B.; (2005)

Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydo spores are distinct from budding and hyphal growth.
Eukaryot Cell 4:1191-202.

Martin G.S., Mannino D.M., Eaton S., Moss M.; (2003)

The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.
N Engl J Med 348:1546-1554.

Martin R., Moran G.P., Jacobsen I.D., Heyken A., Domey J., Sullivan D.J., Kurzai O., Hube B.; (2011)

The *Candida albicans*-Specific Gene *EED1* Encodes a Key Regulator of Hyphal Extension.
PLoS One 6(4):e18394.

McManus B.A., Sullivan D.J., Moran G.P., d'Enfert C., Bougnoux M.E., Nunn M.A., Coleman D.C.; (2009)

Genetic differences between avian and human isolates of *Candida dubliniensis*.
Emerg Infect Dis 15(9):1467-1470.

Mercer E.I.; (1993)

Inhibitors of sterol biosynthesis and their applications.
Prog. Lipid. Res 32:357.

Miller M.G. and Johnson A.D.; (2002)

White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating.
Cell 110:293-302.

Miller S.E., Spurlock B.O., Michaels G.E.; (1974)

Electron microscopy of young *Candida albicans* chlamydospores.
J Bacteriol 119:992–9.

Miyaji M., Nishimura K.; (1977)

Investigation on dimorphism of *Blastomyces dermatitidis* by agar-implantation method.
Mycopathologia 60:73–78.

Monod M., Togni G., Hube B., Sanglard D.; (1994)

Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species.
Mol Microbiol 13:357-368.

Monod M., Hube B., Hess D., Sanglard D.; (1998)

Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*.
Microbiology 144 (Pt 10):2731-2737.

Moran G.P., Coleman D.C., Sullivan D.J.; (2011)

Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi.
Eukaryot Cell 10(1):34-42.

Moran G.P., Sanglard D., Donnelly S.M., Shanley D.B., Sullivan D.J., Coleman D.C.; (1998)

Identification and Expression of Multidrug transporters responsible for Fluconazole Resistance in *Candida dubliniensis*.
Antimicrob. Agents Chemother 42:1819-1830.

Moran G.P., Stokes C., Thewes S., Hube B., Coleman D.C., Sullivan D.; (2004)

Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*.
Microbiology 150(Pt 10):3363-82.

Moran G.P., Sullivan D.J., Henman M.C., McCreary C.E., Harrington B.J., Shanley D.B., Coleman D.C.; (1997)

Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro.
Antimicrob Agents Chemother 41:617-23.

Morrow B., Srikantha T., Anderson J., Soll D.R.; (1993)

Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*.
Infect Immun 61:1823-1828.

Morrow B., Srikantha T., Soll, D.R.; (1992)

Transcription of the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*.
Mol Cell Biol 12:2997-3005.

Morschhäuser J., Barker K.S., Liu T.T., BlaB-Warmuth J., Homayouni R., Rogers P.D.; (2007)

The transcription factor Mrr1p controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*.
PLoS Pathog 3(11):e164.

Morschhäuser J., Michel S., Hacker J.; (1998)

Expression of a chromosomally integrated, single-copy *GFP* gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation.
Mol Gen Genet 257:412-420.

Morschhäuser J., Michel S., Staib P.; (1999b)

Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination.
Mol Microbiol 32:547-556.

Morschhäuser J., Ruhnke M., Michel S., Hacker J.; (1999a)

Identification of CARE-2-negative *Candida albicans* isolates as *Candida dubliniensis*.
Mycoses 42(1-2):29-32.

Morschhäuser J., Staib P., Köhler G.; (2005)

CARE-2 fingerprinting of *Candida albicans* isolates.
Methods Mol Med 118:27-34.

Morschhäuser J., Virkola R., Korhonen T.K., Hacker J.; (1997)

Degradation of human subendothelial extracellular matrix by proteinase-secreting *Candida albicans*.
FEMS Microbiol Lett 153:349-355.

Mosca C.O., Moragues M.D., Llovo J., Al Mosaid A., Coleman D.C., Pontón J.; (2003)

Casein agar: a useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.
J Clin Microbiol 41(3):1259-62.

Murad A.M., Leng P., Straffon M., Wishart J., Macaskill S., MacCallum D., Schnell N., Talibi D., Marechal D., Tekaia F., d'Enfert C., Gaillardin C., Odds F.C., Brown A.J.; (2001a)

NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*.
Embo J 20:4742-4752.

Murad A.M., d'Enfert C., Gaillardin C., Tournu H., Tekaia F., Talibi D., Marechal D., Marchais V., Cottin J., Brown A.J.; (2001b)

Transcript profiling in *Candida albicans* reveals new cellular functions for the transcriptional repressors CaTup1, CaMig1 and CaNrg1.
Mol Microbiol 42(4):981-93.

Mysiakina I.S. and Funtikova N.S.; (2007)

The role of sterols in morphogenetic processes and dimorphism in fungi.
Mikrobiologiia 76:5-18.

Naglik J.R., Rodgers C.A., Shirlaw P.J., Dobbie J.L., Fernandes-Naglik L.L., Greenspan D., Agabian N., Challacombe S.J.; (2003)

Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections.
J Infect Dis. 188(3):469-79.

Nantel A., Dignard D., Bachewich C., Harcus D., Marcil A., Bouin A.P., Sensen C.W., Hogues H., van het Hoog M., Gordon P., Rigby T., Benoit F., Tessier D.C., Thomas D.Y., Whiteway M.; (2002)

Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition.
Mol Biol Cell 13:3452-3465.

Navarro-Garcia F., Sanchez M., Nombela C., Pla J.; (2001)

Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*.
FEMS Microbiol Rev 25:245-268.

Nobile C.J., Bruno V.M., Richard M.L., Davis D.A., Mitchell A.P.; (2003)

Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*.
Microbiology 149(Pt 12):3629-3.

Nobile C.J., Nett J.E., Andes D.R., Mitchell A.P.; (2006)

Function of *Candida albicans* adhesion Hwp1 in Biofilm formation.
Eukaryotic Cell 5(10):1604-1610.

Nobile C.J., Nett J.E., Hernday A.D., Homann O.R., Deneault J.S., Nantel A., Andes D.R., Johnson A.D., Mitchell A.P.; (2009)
 Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1.
PLoS Biol 7(6):e1000133.

Nunn M.A., Schaefer S.M., Petrou M.A., Brown J.R.; (2007)
 Environmental source of *Candida dubliniensis*.
Emerg Infect Dis 13(5):747-750.

O'Connor L., Caplice N., Coleman D.C., Sullivan D.J., Moran G.P.; (2010)
 Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of UME6 expression.
Eukaryot Cell 9:1383-1397.

Odds F.C.; (1988)
Candida and Candidosis: a review and bibliography.
 London: Bailliere Tindall.

Odds F.C.; (1994)
Candida species and virulence.
ASM News 60:313-318.

Odds F.C.; (2000)
 Pathogene fungi in the 21st century.
Trends Microbiol 8:200-201.

Odds F. C. and Bernaerts R.; (1994)
 CHROMagar *Candida*, a new Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species.
J. Clin. Microbiol 32:1923-1929.

Odds FC, Hanson M.F., Davidson A.D., Jacobsen M.D., Wright P., Whyte J.A., Gow N.A., Jones B.L.; (2007)
 One year prospective survey of *Candida* bloodstream infections in Scotland.
J Med Microbiol 56(Pt 8):1066-1075.

Osorio H., Carvalho E., del Valle M., Sillero M.A.G., Moradas-Ferreira P., Sillero A.; (2003)
 H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae* - An experimental and theoretical approach.
Eur J Biochem 270:1578-1589.

Palige K., Linde J., Martin R., Böttcher B., Citiulo F., Sullivan D.J., Weber J., Staib C., Rupp S., Hube B., Morschhäuser J., Staib P.; (2013)
 Global transcriptome sequencing identifies chlamydospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
PLoS One 8(4):e61940. doi: 10.1371/journal.pone.0061940.

Pavlatou M. and Marselou U.; (1961)
 Rapid identification of *Candida albicans* with PCB medium.
J Trop Med Hyg 64:268-70.

Pfaller M.A., Jones R.N., Messer S.A., Edmond M.B., Wenzel R.P.; (1998)
 Blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. Diagnostic microbiology and infectious disease.
Diagnostic microbiology and infectious disease 30:121-129.

Pfaller M.A., Messer S.A., Gee S., Joly S., Pujol C., Sullivan D.J., Coleman D.C., Soll D.R.; (1999)
 In Vitro Susceptibilities of *Candida dubliniensis* Isolates tested against the New Triazole and Echinocandin Antifungal Agents.
J. Clin. Microbiol 37:870-872.

- Phan Q.T., Myers C.L., Fu Y., Sheppard D.C., Yeaman M.R., Welch W.H., Ibrahim A.S., Edwards J.E., Filler S.G.; (2007)**
 Als3 is a *Candida albicans* invasion that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells.
Plos Biology 5(3):543-557.
- Pincus D.H., Coleman D.C., Pruitt W.R., Padhye A.A., Salkin I.F., Geimer M., Bassel A., Sullivan D.J., Clarke M., Hearn V.; (1999)**
 Rapid Identification of *Candida dubliniensis* with Commercial Yeast Identification Systems.
J. Clin. Microbiol 37:3533-3539.
- Pujol C., Daniels K.J., Lockhart S.R., Srikantha T., Radke J.B., Geiger J., Soll D.R.; (2004)**
 The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate.
Eukaryot Cell 3(4):1015-27.
- Quindos G., Carillo-Munoz A.J., Arévalo M.P., Salgado J., Alonso-Vargas R., Rodrigo J. M., Ruesga M.T., Valverde A., Peman J., Canton E., Martin- Mazuelos E., Ponton J.; (2000)**
 In vitro Susceptibility of *Candida dubliniensis* to Current and New Antifungal Agents.
Chemotherapy 46:395-401.
- Raudonis B.M. and Smith A.G.; (1982)**
 Germination of the chlamydo spores of *Candida albicans*.
Mycopathologia 78:87-91.
- Raubitschek F.; (1958)**
 Taurocholat agar for chlamydo spore production by *Candida albicans*.
Mycol Appl 9:285-7.
- Reuss O., Vik A., Kolter R., Morschhäuser J.; (2004)**
 The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*.
Gene 27;341:119-27.
- Rodriguez R.J., Low C., Bottema C.D.K, Parks L.W.; (1985)**
 Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochim. Biophys. Acta 837(3):336-43.
- Ruhnke M. and Maschmeyer G.; (2002)**
 Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer - review of literature.
Eur. J. Med. Res 7(5):227-35.
- Ruhnke M., Schmidt-Westhausen A., Morschhäuser J.; (2000)**
 Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in a patient with AIDS.
J. Antimicrob. Chemother 46:291-295.
- Rutherford J.C. and Bird A.J.; (2004)**
 Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells.
Eukaryot. Cell 3:1-13.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.; (1988)**
 Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA-Polymerase.
Science 239:487-491.
- Samaranayake L.P.; (1992)**
 Oral mycoses in HIV infection.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol 73(2):171-80.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.; (1989)**
 Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Saville S.P., Lazzell A.L., Monteagudo C., Lopez-Ribot J.L.; (2003)

Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection.
Eukaryot Cell 2:1053-1060.

Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B.; (2005)

Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*.
Mycoses 48:365-377.

Scheid L.A., Mario D.A., Kubiça T.F., Santurio J.M., Alves S.H.; (2012)

In vitro activities of antifungal agents alone and in combination against fluconazole-susceptible and -resistant strains of *Candida dubliniensis*.
Braz J Infect Dis 16(1):78-81.

Scheid L.A., Nunes Mario D.A., Soares I.H., Loreto E.S., Santurio J.M., Alves S.H.; (2010)

DRBC agar: a new tool for *Candida dubliniensis* identification.
Folia Microbiol (Praha) 55(2):155-8.

Schoofs A., Odds F.C., Colebunders R., Ieven M., Goossens H.; (1997)

Use of Specialised Isolation Media for Recognition and Identification of *Candida dubliniensis* Isolates from HIV-Infected Patients.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 16:296-300.

Schubert S., Rogers P.D., Morschhäuser J.; (2008)

Gain-of-function mutations in the transcription factor *MRR1* are responsible for overexpression of the *MDR1* efflux pump in fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains.
Antimicrob Agents Chemother 52(12):4274-80.

Shannon J.L.; (1981)

Scanning and transmission electron microscopy of *Candida albicans* chlamydospores.
J Gen Microbiol 125:199-203.

Shapiro R.S., Robbins N., Cowen L.E.; (2011)

Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease.
Microbiol Mol Biol Rev 75(2):213-67.

Sheth C.C., Johnson E., Baker M.E., Haynes K., Mühlischlegel F.A.; (2005)

Phenotypic identification of *Candida albicans* by growth on chocolate agar.
Med Mycol 43(8):735-8.

Si H., Hernday A.D., Hirakawa M.P., Johnson A.D., Bennett R.J.; (2013)

Candida albicans White and Opaque Cells Undergo Distinct Programs of Filamentous Growth.
PLoS Pathog.; e1003210. doi: 10.1371/journal.ppat.1003210. Epub 2013 Mar 7.

Simon G. and Galgoczy J.; (1986)

Chlamydospores of dermatophytes.
Mykosen 29:469-73.

Skaar E.P.; (2010)

The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts.
PLoS Pathog 6: e1000949.

Slutsky B., Staebell M., Anderson J., Risen L., Pfaller M., Soll D.R.; (1987)

"White-opaque transition": a second high-frequency switching system in *Candida albicans*.
J Bacteriol 169:189-197.

Sobel J.D.; (1992)

Pathogenesis and treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis.
Clin Infect Dis 14 (Suppl. 1):148-153.

Srikantha T. and Soll D.R.; (1993)

A white-specific gene in the white-opaque switching system of *Candida albicans*.
Gene 131:53-60.

Staab J.F., Bradway S.D., Fidel P.L., Sundstrom P.; (1999)

Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans*.
Science 283:1535-1538.

Staab J.F. and Sundstrom P.; (1998).

Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene *HWP1* of *Candida albicans*.
Yeast 14:681-686.

Staib F.; (1962)

Cryptococcus neoformans und *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D. C.) Farbreaktionen für *Cryptococcus neoformans*.
Zeitschrift f Hyg 148:466-75.

Staib F. and Arastéh K.; (2001)

Chlamyospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described.
Mycoses 44(1-2):23-7.

Staib P. and Morschhäuser J.; (1999)

Chlamyospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*.
Mycoses 42:521-524.

Staib P. and Morschhäuser J.; (2005)

Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamyospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
Mol Microbiol 55:637-652.

Staib P. und Morschhäuser J.; (2007)

Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*-an enigmatic developmental programme.
Mycoses 50(1):1-12.

Stoldt V.R., Sonneborn A., Leuker C.E., Ernst J.F.; (1997)

Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi.
Embo J 16:1982-1991.

Strippoli V., Simonetti N.; (1975)

Specific induction of chlamyospore formation in *Candida albicans* by N-acetyl-D-glucosamine.
Experientia 31:130-1.

Sonneborn A., Bockmühl D.P., Ernst J.F.; (1999)

Chlamyospore Formation in *Candida albicans* requires the Efg1p Morphogenetic Regulator.
Inf. Immun. 67:5514-5517.

Tsong A.E., Miller M.G., Raisner R.M., Johnson A.D.; (2003)

Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts.
Cell 115:389-399.

Southern E.M.; (1975)

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol 98(3):503-17.

Sudbery P.E.; (2011)

Growth of *Candida albicans* hyphae.
Nat Rev Microbiol 9(10):737-48.

Sudbery P., Gow N., Berman J.; (2004)

The distinct morphogenic states of *Candida albicans*.
Trends Microbiol 12:317-324.

Sullivan D.J. and Coleman D.C. (1998)

Candida dubliniensis: Characteristics and Identification.
J. Clin. Microbiol 36:329-334.

Sullivan D.J., Westerneng T.J., Bennett D.E., Coleman D.C.; (1995)

Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals.
Microbiology 141:1507-1521. *J Mol Biol* 98: 503-517.

Sundstrom P.; (2002)

Adhesion in *Candida* spp.
Cell Microbiol 4(8):461-9.

Sundstrom P., Cutler J.E., Staab J.F.; (2002)

Reevaluation of the role of *HWP1* in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker *URA3* targeted to the *ENO1* locus.
Infection and Immunity 70:3281-3283.

Tintelnot K., Haase G., Seibold M., Bergmann F., Staemmler K., Franz T., Naumann D.; (2000)

Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*.
J. Clin. Microbiol 38:1599-1608.

Torosantucci A. and Cassone A.; (1983)

Induction and morphogenesis of chlamydospores in an aegerminative variant of *Candida albicans*.
Sabouraudia 21:49-57.

Tsong A.E., Miller M.G., Raisner R.M., Johnson A.D.; (2003)

Evolution of a combinatorial transcriptional circuit: a case study in yeasts.
Cell 115:389-399.

Tuch B.B., Mitrovich Q.M., Homann O.R., Hernday A.D., Monighetti C.K., De La Vega F.M., Johnson A.D.; (2010)

The transcriptomes of two heritable cell types illuminate the circuit governing their differentiation.
PLoS Genet 6(8):e1001070.

Uhl M.A., Biery M., Craig N., Johnson A.D.; (2003)

Haploinsufficiency-based large-scale forward genetic analysis of filamentous growth in the diploid human fungal pathogen *C.albicans*.
EMBO Journal vol. 22, no. 11, pp:2668-2678.

Valentin E., Mormeneo S., Sentandreu R.; (2000)

The cell surface of *Candida albicans* during morphogenesis.
Contrib Microbiol 5:138-150.

Vidotto V., Bruatto M., Accattatis G., Caramello S.; (1996)

Observation on the nucleic acids in the chlamydospores of *Candida albicans*.
New Microbiol 19:327-34.

Wächtler B., Wilson D., Haedicke K., Dalle F., Hube B.; (2011)

From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells.
Plos One 6(2):1-14.

Wang Z., Gerstein M., Snyder M.; (2009)

RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.
Nat RevGenet 10(1): p. 57-63.

Wang Y., Tang J.W., Ma W.Q., Feng J.; (2009)

Dietary Zinc Glycine Chelate on Growth Performance, Tissue Mineral Concentrations, and Serum Enzyme Activity in Weanling Piglets.

Biol Trace Elem Res 133(3):325-34.

Waters B.M. and Eide D.J.; (2002)

Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen.

J Biol Chem 277(37):33749-57.

Williamson P.R., Huber M.A., Bennett J.E.; (1993)

Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*.

Biochem J 291 (Pt 3):765-71.

Wirsching S., Moran G.P., Sullivan D.J., Coleman D.C., Morschhäuser J.; (2001)

MDR1-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*.

Antimicrob Agents Chemother ;45(12):3416-21.

Wu C.Y., Bird A.J., Chung L.M., Newton M.A., Winge D.R., Eide D.J.; (2008)

Differential control of Zap1-regulated genes in response to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*.

BMC Genomics 9:370.

Zeidler U., Lettner T., Lassnig C., Muller M., Lajko R., Hintner H., Breitenbach M., Bito A.; (2009)

UME6 is a crucial downstream target of other transcriptional regulators of true hyphal development in *Candida albicans*.

FEMS Yeast Res 9:126-142.

Zhao H., Butler E., Rodgers J., Spizzo T., Duesterhoeft S., Eide D.; (1998)

Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the *ZAP1* transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements.

J Biol Chem 273(44):28713-20.

Zhao H. and Eide D.; (1996a)

The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation.

Proc Natl Acad Sci U S A 93(6):2454-8.

Zhao H. and Eide D.; (1996b)

The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biol Chem 271(38):23203-10.

Zhao H. und Eide D.J.; (1997)

Zap1p, a metalloreulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mol Cell Biol 17(9):5044-52.

Zordan R.E., Miller M.G., Galgoczy D.J., Tuch B.B., Johnson A.D.; (2007)

Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*.

PLoS Biol 5(10):e256.

Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., Shou C., Raha D., Gerstein M., Snyder M.; (2008)

The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing.

Science 6;320(5881):1344-9.

Artikel:

Michael Eckerstorfer, Frank Narendja, Rene Roschko, Andreas Heissenberger und Helmut Gaugitsch
Gutachten zum Stand und zu den Möglichkeiten des Einsatzes von OMICS-Technologien in der GVO-Bewertung.

Anhang

Tab. 19: Übersicht der herauf regulierten Gene (84) der *C. albicans nrg1Δ*-Mutante und des *C. dubliniensis* Wildtyps im Vergleich zum *C. albicans* Wildtyp in Staib-Medium während der Chlamydosporenentwicklung.

<i>C. albicans</i> ID	Name	<i>C. dubliniensis</i> ID	Relative Expression (log ₂ fold)	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i>	<i>C. dubliniensis</i>
orf19.3981	“MAL31”	CD36_54530	4.42	3.74
orf19.1117		CD36_53500	3.90	1.68
orf19.3982		CD36_54540	3.66	4.48
orf19.5532		CD36_62900	3.24	4.20
orf19.207	“PGA55”	CD36_23160	3.15	1,98
orf19.5784		CD36_17890	2.43	1.69
orf19.5169		CD36_72580	2.40	4.79
orf19.7437		CD36_86460	2.05	3.26
orf19.1766	“LIP4”	CD36_24190	1.87	2.79
orf19.2506		CD36_80940	1.85	3.16
orf19.2133		CD36_65300	1.77	6.25
orf19.7209		CD36_13000	1.76	1.78
orf19.6323	“UBC8”	CD36_60110	1.64	1.14
orf19.4540		CD36_01670	1.58	0.97
orf19.2065		CD36_15580	1.57	2.55
orf19.1239		CD36	1.54	0.88
orf19.5019	“RFX2”	CD36_12800	1.52	1.17
orf19.1582		CD36_17330	1.48	1.03
orf19.4590		CD36_41920	1.45	2.41
orf19.7379		CD36_85910	1.45	1.49
orf19.3885	“FAA2”	CD36_31810	1.37	5.80
orf19.272		CD36_82800	1.22	1.09
orf19.732		CD36_32760	1.13	1.47
orf19.6741		CD36_87380	1.11	3.00
orf19.4170	“FAA21”	CD36_40770	1.06	4.34
orf19.4779		CD36_08690	1.05	2.52
orf19.87		CD36_60870	1.01	3.76
orf19.3330.3		CD36_01320	1.00	8.70
orf19.1723	“GPX1“	CD36_81220	0.96	1.35
orf19.4370		CD36_28920	0.89	0.89
orf19.7100		CD36_70440	0.88	0.75
orf19.346		CD36_83480	0.87	0.61

Orf19 ID	Name	Dub ID	Relative Expression (log ₂ fold)	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i>	<i>C. dubliniensis</i>
orf19.2270	“SMF12”	CD36_21430	0.81	1.87
orf19.3041		CD36_03200	0.81	1.11
orf19.6061		CD36_00400	0.81	1.48
orf19.4589		CD36_41930	0.78	1.04
orf19.164	“DEF1”	CD36_27530	0.76	1.87
orf19.7561		CD36_34980	0.73	4.03
orf19.6629		CD36_31220	0.73	2.41
orf19.2896		CD36_45880	0.72	3.00
orf19.4864	“SOU1”	CD36_09380	0.68	1.85
orf19.7111		CD36_70330	0.68	1.20
orf19.338		CD36_83380	0.65	0.65
orf19.3633		CD36_22590	0.63	2.78
orf19.3040	“EHT1”	CD36_03190	0.63	1.13
orf19.3865	“RFX1”	CD36_31600	0.60	3.05
orf19.3740		CD36_27260	0.60	0.99
orf19.6556		CD36_71520	0.58	1.84
orf19.2124		CD36_65100	0.58	1.61
orf19.2848	“PDR16”	CD36_27980	0.57	1.35
orf19.1027		CD36_03560	0.56	1.18
orf19.5059		CD36_07400	0.55	1.82
orf19.2459		CD36_05560	0.54	1.18
orf19.2738	“SUL2”	CD36_42530	0.53	4.32
orf19.2284		CD36_21540	0.51	1.16
orf19.3259		CD36_25990	0.51	1.43
orf19.6530		CD36_71720	0.51	0.71
orf19.4201	“NHX1”	CD36_60500	0.51	0.64
orf19.2962		CD36_02530	0.48	3.89
orf19.6570		CD36_71390	0.47	4.25
orf19.5713		CD36_63450	0.46	1.66
orf19.7537	“BNR1”	Cd36_25090	0.46	0.88
orf19.6148		CD36_32850	0.45	2.37
orf19.137		CD36_61400	0.44	3.14
orf19.7141		CD36_73930	0.43	1.16
orf19.6003	“UFE1”	CD36_85240	0.42	1.95
orf19.3050		CD36_03270	0.42	1.94

Orf19 ID	Name	Dub ID	Relative Expression (log ₂ fold)	
			<i>C. albicans nrg1Δ</i>	<i>C. dubliniensis</i>
orf19.4245		CD36_52160	0.41	1.59
orf19.897		CD36_18060	0.41	1.12
orf19.543	“FUM11“	CD36_29890	0.41	0.90
orf19.1979	“GIT1“	CD36_51400	0.39	2.80
orf19.6512	“EXO70“	CD36_71870	0.39	1.10
orf19.2317		CD36_10300	0.38	5.69
orf19.6202	“RBT4“	CD36_06570	0.37	0.84
orf19.3104	“YDC1”	CD36_46520	0.34	2.08
orf19.5174	“TAF19”	CD36_72550	0.34	1.48
orf19.6525		CD36_71770	0.33	1.20
orf19.3432		CD36_61640	0.32	2.97
orf19.1848.1		CD36_32390	0.32	1.44
orf19.1754		CD36_24320	0.32	0.84
orf19.2457		CD36_05580	0.31	2.13
orf19.5804	“HYU1“	CD36_17760	0.31	1.28
orf19.6048		CD36_00510	0.31	0.96
orf19.3501		CD36_62230	0.29	1.61

Publikationsliste

Palige K., Linde J., Martin R., Böttcher B., Citiulo F., Sullivan D.J., Weber J., Staib C., Rupp S., Hube B., Morschhäuser J., Staib P.; (2013)
Global transcriptome sequencing identifies chlamydospore specific markers in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.
PLoS One 8(4):e61940. doi: 10.1371/journal.pone.0061940.

Hennicke F., Grumbt M., Lermann U., Ueberschaar N., **Palige K.**, Böttcher B., Jacobsen I.D., Staib C., Morschhäuser J., Monod M., Hube B., Hertweck C., Staib P.; (2013)
Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in *Candida albicans*.
Eukaryot Cell (4):604-13. doi: 10.1128/EC.00336-12. Epub 2013 Feb 15.

Petermann A., Miene C., Schulz-Raffelt G., **Palige K.**, Hölzer J., Glei M., Böhmer F.D.; (2009)
GSTT2, a phase II gene induced by apple polyphenols, protects colon epithelial cells against genotoxic damage.
Mol Nutr Food Res. 53(10):1245-53.

Tagungsbeiträge-Poster

Palige K., Linde J., Citiulo F., Sullivan D.J., Rupp S., Morschhäuser J., Hube B., Staib P.
Identification and Analysis of Morphology- and Virulence-related Genes in *Candida dubliniensis*.
ASM Conference on Candida and Candidiasis (11th), 2012, San Francisco, USA, März-April 2012

Palige K., Linde J., Citiulo F., Sullivan D.J., Rupp S., Morschhäuser J., Hube B., Staib P.
Comparative global transcriptome analysis of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* allows new insights into chlamydospore development.
VAAM Jahrestagung 2012, Tübingen, März 2012

Böttcher B., **Palige K.**, Shelest E., Staib P.
Identification of virulence related genes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by comparative genetic analysis.
DGHM 2012; Hamburg, September 2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katja Maria-Theresa Palige
Geburtsdatum: 07.06.1982
Geburtsort: Sömmerda

Ausbildungsdaten & wissenschaftliche Anstellung

09/1989 - 06/1993	Pestalozzi-Grundschule; Sömmerda
09/1993 - 06/2001	Albert-Schweitzer-Gymnasium; Sömmerda
Juni 2001	Abschluss Abitur (Note 1,3)
10/2001-04/2007	Studium der Ernährungswissenschaft an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss als Diplom-Trophologin
Oktober 2003	Vordiplom
10/2005 - 10/2006	Diplomarbeit (Note 1,3) Universitätsklinikum Jena; Institut für Molekulare Zellbiologie
April 2007	Beendigung des Studiums (Note 1,7)
11/2007 – 02/2008	wissenschaftliche Mitarbeiterin Friedrich-Schiller-Universität Jena; Institut für Ernährungswissenschaften; Lehrstuhl für Humanernährung
03/2008 – 03/2013	Doktorarbeit Leibniz Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V.; Hans-Knöll-Institut (HKI) Nachwuchsgruppe: Molekularbiologische Grundlagen pathogener Pilze Thema: „ Identifizierung und Analyse chlamydosporen- spezifischer Gene in <i>Candida albicans</i> und <i>Candida dubliniensis</i> „

Jena, Mai 2013

.....
Katja Palige

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einer Vielzahl von Menschen, Kollegen und Freunden bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hier können nur einige wenige erwähnt werden, jedoch gilt allen ungenannt bleibenden selbstverständlich ebenfalls ein großes Dankeschön!

Zuerst möchte ich mich bei Dr. rer. nat. habil. Peter Staib für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe „Molekularbiologische Grundlagen pathogener Pilze“ zu lernen und zu arbeiten bedanken. Zudem bedanke ich mich für die Betreuung und Unterstützung, die vielen guten Ideen und dem steten Interesse am erfolgreichen Fortgang meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Bernhard Hube für die bereitwillige Übernahme der Zweitgutachtens und für die Möglichkeit in seinem Labor die DNA-Microarrays durchführen zu können. Auch bedanke ich mich für die immer freundliche und enge Zusammenarbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Jochiam Morschhäuser bedanken, dass er die Aufgabe meines externen Gutachters übernommen hat. Darüber hinaus hat er mit der Bereitstellung von Material und Ideen stets zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen.

Ein Dankeschön gilt ebenfalls PD Dr. Johann Weber für die Durchführung der RNA-Sequenzierung und die gute Zusammenarbeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei PD Dr. Steffen Rupp für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Ronny Martin. Zum einen für die gemeinsame Durchführung der DNA-Microarrays und der qRT-PCR und zum anderen für die stets hilfsbereite, geduldige und immer freundliche Unterstützung während der gesamten Promotion. Darüber hinaus für die zahlreichen Anregungen, Kritiken und Hinweise sowie die tollen Gespräche in den „außerlaborischen-Meetings“. Vielen Dank!!!

Dr. Jörg Linde möchte ich für die Auswertung der gesamten Arraydaten sowie der freundlichen und geduldigen Beantwortung aller „bioinformatischer“ Fragen danken.

Dr. Ilse Jacobsen möchte ich für die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen danken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem allen Mitgliedern der „AG Myk“, Maria, Betti, Sandra, Antje und Flo. Es hat Spaß gemacht mit Euch zusammenzuarbeiten und ich freue mich, dass wir über die Jahre auch Freunde geworden sind. Bei Maria möchte ich mich noch einmal besonders bedanken für alle fachlichen und nicht-fachlichen Gespräche und für die Unterstützung in schwereren Zeiten. Es war schön den Weg mit dir zusammen zu gehen! Danke! Fee, Chrischan, Markus, Shruthi und Daniela-es war schön mit Euch auf einem Flur! Ebenfalls gilt ein besonderer Dank Bianka und Tino. Danke für alle Ratschläge, Hinweise, fürs Lesen und stete Helfen in jeder Situation.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie für die jahrelange Unterstützung und den Zuspruch zu jeder Zeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich Torben für die liebevolle und unentwegte Unterstützung danken. Für die Geduld und Hilfe ganz besonders in den letzten Monaten-ohne dich hätte ich das nicht geschafft! Danke!

Eigenständigkeitserklärung

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt. Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials haben mich die in der Danksagung der Dissertation genannten Personen unterstützt. Personen, die bei der Anfertigung der Publikationen beteiligt waren, sind in der Publikationsliste angegeben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Außerdem haben Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, welche im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, erhalten.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich nicht versucht, diese Arbeit oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Jena, Mai 2013

.....
Katja Palige